

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



**ESTUDIO DE LA O- β -N-ACETIGLICOSILACIÓN
PROTEICA EN LA ARTROSIS HUMANA Y
EXPERIMENTAL**

TESIS DOCTORAL

LIDIA TARDÍO MORA

MADRID, 2013

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**ESTUDIO DE LA O- β -N-ACETIGLICOSILACIÓN
PROTEICA EN LA ARTROSIS HUMANA Y
EXPERIMENTAL**

TESIS DOCTORAL

**LIDIA TARDÍO MORA
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

DIRECTORES: RAQUEL LARGO CARAZO Y GABRIEL HERRERO-BEAUMONT

LABORATORIO DE PATOLOGÍA OSTEOARTICULAR

IIS-FUNDACIÓN JIMENÉNEZ DÍAZ

Doña Raquel Largo Carazo, Doctora en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid y Don Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca, Doctor en Medicina y Profesor titular de Medicina en la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN

Que Doña Lidia Tardío Mora, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado y elaborado en el laboratorio de Patología Osteoarticular del IIS-Fundación Jiménez Díaz, bajo nuestra dirección, la presenta Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid, a 3 de junio de 2013.

Dra. Raquel Largo Carazo

Dr. Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

Doctorando: Lidia Tardío Mora

IIS-Fundación Jiménez Díaz. Avenida de los Reyes Católicos, 2, 28040 (Madrid)

Hace más de doce años tomé una decisión que afectaría al resto de mi vida. Decidí estudiar Biología a pesar de ser una carrera con un futuro incierto. Sin embargo la vocación pudo con la razón y doce años después soy bióloga, me he formado como investigadora y por fin ha llegado el momento de leer mi tesis.

El camino no ha sido fácil pero en todo momento me he sentido protegida y muy bien acompañada. Es por eso que esta tesis se la quiero dedicar y agradecer a todos aquellos que han caminado a mi lado y que han sabido como levantarme en los momentos en los que me he visto más cerca del suelo que del cielo.

En primer lugar quiero agradecer a mis padres los casi 31 años de apoyo incondicional que me han brindado. Ellos han sido mi verdadera inspiración. No conozco a nadie con la fuerza, el valor y los principios que tenéis vosotros. Habéis sido capaces de levantar, hacer crecer y mantener un negocio de la nada, con vuestras manos y con las ganas de luchar y de sacar adelante a nuestra pequeña familia. Sois toda una lección de superación personal y el mejor ejemplo que he podido tener. Me habéis enseñado a ser constante, a ser eficaz, a ser trabajadora y me habéis dado la oportunidad de realizarme profesionalmente en lo que más me gusta: la ciencia. Pero sobretodo me habéis enseñado que lo más importante es la calidad humana. No hay palabras para expresar mi agradecimiento. Sólo puedo decir que os quiero. Gracias papá y mamá.

Pablo, mi amigo, mi compañero, mi confidente, mi marido, mi familia, mi amor. Nunca me has fallado y sé que nunca lo harás. Eres realmente una persona muy especial. Tan bueno, tan comprensivo. Todos estos años a tu lado me han convertido en mejor persona. Tú has sabido hacer de este camino un camino de rosas y me has enseñado a sortear las espinas. Eres capaz de ver siempre la cara amable y positiva de todas y cada una de las situaciones complicadas. Tu fuerza y tu actitud emprendedora hacen que cada día sea un reto. Le das a mi vida la chispa que necesita para vivir cada momento con ilusión. Gracias mi amor. Te quiero.

No quiero dejar pasar la oportunidad de agradecer a mi hermano Alejandro, todos estos años de apoyo, risas, confianzas y cariño, sobretodo de cariño. Hermano, sabes que los dos tenemos mucho carácter, pero siempre acabamos entendiéndonos. Gracias por las tardes en la terraza de casa. Siempre me tendrás a tu lado, lo sabes. Te quiero pequeño.

Quiero agradecer también a mis abuelos su apoyo incondicional y su confianza. Habéis luchado por mí y siempre habéis tenido palabras de consuelo cuando las he necesitado.

Quiero agradecer también esta tesis a mi familia. A mi prima Aranza, que aunque ya lleva unos años lejos siempre la he tenido a mi lado. Gracias por las horas y horas al teléfono escuchando

y aconsejando. Gracias a mi otra familia. Angelines y Carlos, sois dos personas maravillosas y espero y deseo educar a mi hija la mitad de bien que lo habéis hecho vosotros con vuestros hijos. Angelines, gracias por ser tan cariñosa y acogerme como a una hija. Carlos, gracias por tus valiosas lecciones sobre la vida, eres una gran influencia para mí. Gracias a mis cuñados M^a Ángeles, Manolo, Carlos, Julio, Carmen y Vanesa por haber confiado en mí y hacer que me sienta parte de una familia tan especial. M^a Ángeles, a ti quiero agradecerte de forma especial las trades que has cuidado de Paula para que yo pudiera dedicarle un ratito más a la tesis ¡Y gracias por llevarla o “casi” llevarla a la piscina (jeje)! Gracias a mis tíos “postizos” Juani, Isabel, Juan y Diego. Siempre habéis apostado por mí, siempre habéis hablado de mí con orgullo y siempre me habéis tendido una mano cuando la he necesitado, es por eso que sois y seréis siempre mi familia.

A mis amigos. Quiero dedicaros unas palabras de agradecimiento a todos aquellos que habéis compartido conmigo este duro camino. En especial a mi amiga Leticia, compañera de batallas, de clase y de la vida en general. Qué suerte tuve de haberte conocido porque eres realmente una gran mujer y tienes un gran corazón. No puedo olvidarme de Paloma, que hizo de mis dos primeros años de carrera los más divertidos y sinceros de toda mi vida. Gracias por compartir un Sandwich a medias y por los “tontitos de pinchilla”. María, Jimena y Ana a vosotras os debo la felicidad más inocente que solo se tiene cuando vas al cole. Gracias a todas por estar aún en mi vida.

Voy llegando al final y quiero agradecer sinceramente todo el apoyo que me han dado a mis compañeros de laboratorio. Han sido seis años y son muchas las personas con las que he compartido no sólo poyata, sino también la vida misma. Me llevo amigos verdaderos y muy buenos momentos. M^a Ángeles, Juan, Miriam, Mercedes, M^a José, Laura y Rosa, con vosotros he vivido la primera parte de mi tiempo en el laboratorio y he de decir que la experiencia fue tan impresionante que ha sido muy difícil, por no decir imposible de superar. Pusisteis el listón demasiado alto porque os he llegado a considerar una verdadera familia. El día a día nos enseñó valores tan importantes como el trabajo en equipo y el compañerismo por encima de todo. El momento profesional en el que más cómoda y apoyada me he sentido ha sido sin duda esta primera etapa. Quiero agradecer de manera especial a Juan porque ha sido para mí imprescindible. Eres un gran amigo y te he echado mucho de menos, no sólo como compañero de poyata sino también como consejero personal y por supuesto como compañero de cañas y “Bombay Sapphire con Tónica en vaso de balón con tres hielos y un chorrito de limón natural.” No he encontrado a nadie que esté a tu altura y me siento afortunada de haberme cruzado contigo en esta vida. También a ti MJ, eres una mujer diez. He aprendido mucho a tu lado.

Tienes mucho que ofrecer como amiga y como profesional de la investigación. Espero que se me haya pegado aunque sea un poquito de tu fuerza y de tu manera de encarar la vida. Rosa, no cambies nunca. Eres estupenda y me encanta hablar contigo. Me has tratado como a una hija y por eso te agradezco cada día que hemos pasado juntas. M^a Ángeles, gracias por transmitirme tus ganas de trabajar. Miriam, eres genial. He pasado momentos contigo que voy a recordarlos toda mi vida, te lo aseguro. Merche, siempre he pensado que has nacido en el país equivocado por tu insistencia diaria en comer a las 12:00 a.m. Te he echado mucho de menos, nadie me imita cantando como tú.

En los últimos años, se han incorporado al laboratorio personas excepcionales que merecen mi gratitud por haber estado ahí cuando los he necesitado. Antonio, Marta, Jessica, Iván, Ruddy, Amanda y Ane. Sois un grupo estupendo y estoy segura de que vais a llegar muy lejos en este mundo, tan lejos como os lo propongáis. Os deseo la mejor de las suertes. Iván y Jessica, aprovechad y disfrutad de la estancia que no todos tienen la oportunidad que se os ha brindado. Ruddy y Amanda os agradezco sinceramente vuestra generosa y desinteresada ayuda con los experimentos *in vitro*, en un momento que fue complicado para mí. Antonio y Marta, gracias sinceramente por ser como sois, cada uno especial a su manera, habéis sido importantes para mí y habéis estado a mi lado siempre. Ane, me hubiese gustado haber compartido contigo más tiempo porque creo que eres una tía estupenda y que vas a dar mucho de ti.

Quiero darle las gracias de manera especial a Natasha. Ella me atendió, me enseñó y fue mi mayor apoyo en Baltimore. Fue una estancia muy dura para mí porque supuso alejarme de las personas que más quiero y me resultó muy doloroso. Sin embargo, Natasha supo entenderme por su situación personal y con ella recuperé la motivación y la ganas de seguir adelante. Me enseñó una cara de la investigación que me sorprendió. No he conocido a nadie con tanta ilusión y tantas ganas por aprender cada día algo nuevo. La considero la mejor profesional que he conocido y haber podido trabajar codo con codo con ella, ha supuesto para mí un antes y un después. Gracias por enseñarme un camino lleno de retos y superaciones que poder tomar como el mejor de los ejemplos.

Gabriel y Raquel, mis directores y mentores. Me disteis una oportunidad de demostraros de lo que era capaz y casi siete años después este es el resultado de vuestra confianza y de todo lo que he aprendido a vuestro lado. Os agradeceré siempre que me hayáis iniciado en este mundo y que me hayáis dado la formación necesaria para enfrentarme a nuevos retos en el futuro.

Y por último he querido dejar para el final a mi estrella, mi princesa. Paula eres la alegría de mi vida. Aún eres muy pequeña para entender qué está haciendo mamá, pero aún así quiero darte las gracias por tu sonrisa, por tus abrazitos y por tirarme besos con tus manitas. Haces que olvide cualquier problema porque cuando te miro solo me sale sonreír. Ha sido todo un reto tratar de ser una buena mamá, buena esposa y además cumplir en el laboratorio. Conciliar la vida personal y profesional no es tarea fácil y sin embargo no cambiaría nada de estos dos últimos años. Papá me ha ayudado mucho y gracias a él he podido disfrutar de ti y de mi trabajo. Eres increíble, impresionante y te quiero tanto que me duele el alma. Esta tesis os la dedico especialmente a papá y a ti, porque sois lo más importante de mi vida y sin vosotros, no lo hubiese conseguido. Gracias.

“Lo difícil se consigue, lo imposible se intenta”

(Napoleón Bonaparte)

“Nunca sabe una persona de lo que es capaz hasta que lo intenta”

(Charles Dickens)

La artrosis (OA) es la enfermedad articular más frecuente en la población adulta de más de 65 años. El deterioro estructural afecta a todos los tejidos de la articulación, motivo por el cual se considera una enfermedad de órgano. Son múltiples los factores de riesgo que participan en el desarrollo de la artrosis, dando lugar a fenotipos clínicos muy diferentes pero con ciertos cambios patológicos comunes que provocan dolor, deformación y pérdida de la función articular. Actualmente, no se conocen tratamientos capaces de frenar el avance de la enfermedad. Esta situación pone de manifiesto la necesidad de investigar nuevos mecanismos celulares que puedan intervenir en la reparación del daño articular.

En esta tesis, hemos estudiado el sistema de *O-linked-β-N-Acetil-Glicosilación* (O-GlcNAcilación) de proteínas, como un nuevo mecanismo de daño celular en los condrocitos artrósicos, que podría participar en el desarrollo de la enfermedad. Se trata de una modificación postraducciona, que regula la función de más de 3.000 proteínas y cuya alteración se ha relacionado con enfermedades crónicas, degenerativas y asociadas a la edad.

Hemos demostrado, que en el cartílago articular de pacientes artrósicos, el sistema O-GlcNAc está activado y esto se traduce en la acumulación de proteínas O-GlcNAcadas. Además, hemos demostrado in vitro, que la citoquina pro-inflamatoria IL-1 α , muy abundante en las articulaciones artrósicas, estimula el sistema O-GlcNAc e induce la acumulación de proteínas O-GlcNAcadas, en condrocitos artrósicos en cultivo.

En esta tesis, hemos utilizado un modelo experimental de artrosis inducida por inestabilidad articular en conejos, en el que hemos reproducido la activación del sistema O-GlcNAc, observada en los pacientes. En este modelo, hemos demostrado que el sulfato de glucosamina (SG), conocido modulador del sistema O-GlcNAc y un fármaco utilizado en el tratamiento contra la artrosis, es capaz de revertir las alteraciones estructurales y la síntesis de marcadores biológicos característicos de la artrosis. Además, podría atenuar la cascada pro-inflamatoria mediada por NF- κ B, a través de la modulación de la O-GlcNAcilación de la subunidad p65.

El planteamiento de esta tesis, permite valorar nuevas hipótesis que incluyen mecanismos celulares, cuya alteración podría ser la diana terapéutica de futuros tratamientos que eviten la progresión de la artrosis.

Osteoarthritis (OA) is more common joint disease in adults over 65 years. The structural deterioration affects all tissues of the articulation, because of that is considered an organ disease. There are multiple risk factors involved in the development of osteoarthritis, giving rise to very different clinical phenotypes but with certain common pathological changes that cause pain, loss of function and joint deformation. Currently, treatments can slow down the progression of the disease are not known. This situation highlights the need to investigate new cellular mechanisms that can intervene in the repair of articular damage.

In this thesis, we have studied the system of O-linked- β -N-acetyl-glycosylation (O-GlcNAcylation) of proteins, as a new mechanism of cellular damage in osteoarthritic chondrocytes, which could participate in the development of the disease. It is a posttranslational modification, which regulates the function of more than 3.000 proteins and whose alteration has been linked to chronic, degenerative and age-associated diseases.

We have shown in articular cartilage from osteoarthritic patients, an activation of O-GlcNAc system and this results in the accumulation of O-GlcNAcylated proteins. Moreover, we have demonstrated in vitro that the proinflammatory cytokine IL-1 α , stimulates the O-GlcNAc system and induces the accumulation of O-GlcNAcylated proteins, in osteoarthritic chondrocytes in culture.

In this thesis, we have used an experimental model of instability-induced osteoarthritis in rabbits, in which we have reproduced the activation of the O-GlcNAc system, observed in patients. In this model, we have shown that glucosamine sulfate (GS), known as a O-GlcNAc system modulator and a drug used in the treatment for osteoarthritis, is able to reverse structural alterations and synthesis of biological markers characteristic of osteoarthritis. In addition, it could attenuate proinflammatory cascade through the modulation of the O-GlcNAcylation of the p65 subunit-mediated NF- κ B.

The approach of this thesis, allows to assess new hypotheses including cellular mechanisms, whose alteration could be the therapeutic target of future treatments that prevent the progression of osteoarthritis.

| | |
|--|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. LA ARTROSIS | 1 |
| 1.1 El cartílago: Estructura y alteraciones durante la artrosis. | 3 |
| 1.2 Otras estructuras articulares afectadas. | 8 |
| 2. NUEVOS MECANISMOS DE DAÑO CELULAR EN EL CONDROCITO: LA GLICOSILACIÓN | 9 |
| 2.1 La O- β -N-acetilglicosilación de proteínas. | 13 |
| 2.1.1 La Ruta de las Hexosaminas (<i>Hexosamine Biosynthesis Pathway</i> : HBP). | 14 |
| 2.1.2 Proteínas modificadas por el proceso de O-GlcNAcilación. | 14 |
| 2.1.3 Las enzimas de la O-GlcNAcilación proteica. | 15 |
| • OGT (uridina difosfo-N-acetilglucosamina:polipéptido β -acetilglucosaminil transferasa). | 15 |
| • OGA (β -N-acetilglucosaminidasa). | 16 |
| 2.2 Fisiopatología de la O-GlcNAcilación de proteínas. | 17 |
| 3. EL SULFATO DE GLUCOSAMINA (SG) Y LA MODULACIÓN DE LA O-β-N-ACETILGLICOSILACIÓN PROTEICA | 18 |
| II. OBJETIVOS | 22 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| 1. Estudios en pacientes. | 24 |
| 2. Estudios en animales. | 24 |
| 3. Cultivos celulares: Condrocitos artrósicos humanos (COH). | 27 |
| 4. Extracción de proteínas totales. | 28 |
| 5. Extracción de proteínas nucleares y citoplásmicas. | 28 |
| 6. Western blot. | 29 |
| 7. Inmunoprecipitación. | 30 |
| 8. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). | 31 |

| | |
|---|--------|
| 9. Análisis del control de carga (BCA y EZBlue). | 31 |
| 10. Inmunohistoquímica. | 32 |
| 11. Estudios histopatológicos del cartílago. | 33 |
| 12. Análisis estadísticos. | 34 |
| IV. RESULTADOS | 36 |
| I. ESTUDIO DEL SISTEMA DE O- β -N-ACETILGLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS Y DE LOS MARCADORES DE HIPERTROFIA CONDROCITARIA, EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR DE PACIENTES CON ARTROSIS AVANZADA, EN COMPARACIÓN CON DONANTES SANOS. | 36 |
| I.1 Información de los pacientes. | 36 |
| I.2 Cuantificación de las proteínas O-GlcNAcizadas en el cartílago articular de pacientes artrósicos y de donantes sanos. | 37 |
| I.3 Estudio de las enzimas OGT y OGA en el cartílago articular y en los condrocitos aislados de los pacientes con artrosis. | 39 |
| I.3.1 Determinación de las diferentes isoformas de la enzima OGT. | 39 |
| I.3.2 Síntesis de OGT y OGA en pacientes con artrosis. | 42 |
| I.3.3 Localización de OGT en el cartílago articular de pacientes con artrosis. | 44 |
| I.4 Análisis de los marcadores de hipertrofia sintetizados en el cartílago articular de los pacientes con artrosis. | 45 |
| II. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL SISTEMA DE O- β -N-ACETILGLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS, EN CONDROCITOS OA HUMANOS IN VITRO, ESTIMULADOS CON LA CITOQUINA IL-1 α . | 47 |
| II.1 Cuantificación de las proteínas O-GlcNAcizadas en COH estimulados con IL-1 α . | 47 |
| II.2 Síntesis de las enzimas OGT y OGA en COH estimulados con IL-1 α . | 48 |
| III. ESTUDIO DEL SISTEMA DE O- β -N-ACETILGLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ARTROSIS EN CONEJO. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL SULFATO DE GLUCOSAMINA (SG) SOBRE LA O- β -N-ACETILGLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS, MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN ORAL Y PREVENTIVA A LOS CONEJOS ARTRÓSICOS. | 49 |
| III.1 Modulación de la O-GlcNAcización proteica durante la evolución de la artrosis. | 49 |

| | |
|---|-----------|
| III.1.1 Estudio del patrón de proteínas O-GlcNAcizadas durante la artrosis. | 49 |
| III.1.2 Síntesis de OGT y OGA durante la artrosis. | 51 |
| III.2 Alteraciones estructurales y moleculares de la articulación artrósica en el modelo experimental. | 52 |
| III.2.1 Histopatología del cartílago articular artrósico de los conejos. | 53 |
| III.2.2 Estudio de los parámetros estructurales y pro-inflamatorios medidos en las rodillas de los conejos artrósicos. | 54 |
| • Análisis de los parámetros estructurales medidos en cartílago y hueso subcondral de las rodillas de los conejos artrósicos. | 54 |
| • Análisis de los parámetros pro-inflamatorios medidos en el cartílago de los conejos artrósicos. | 56 |
| III.3 Efecto del sulfato de glucosamina (SG) sobre la modulación del sistema O-GlcNAc y otras alteraciones del cartílago artrósico, en el modelo experimental. | 57 |
| III.3.1 Histopatología del cartílago articular del modelo experimental. | 57 |
| III.3.2 Modulación del sistema de O-GlcNAcización de proteínas en el modelo experimental. | 58 |
| • Estudio del patrón de proteínas O-GlcNAcizadas. | 58 |
| • Análisis de las enzimas OGT y OGA. | 59 |
| III.3.3 Modulación de la inflamación en el modelo experimental: estudio de la síntesis de Cox-2. | 61 |
| III.3.4 Estudio del factor de transcripción NF- κ B en el modelo experimental. | 61 |
| IV. ESTUDIO DEL EFECTO DEL SG SOBRE LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL NF-κB A TRAVÉS DE LA MODIFICACIÓN DE LA O-β-N-ACETILGLICOSILACIÓN DE LA SUBUNIDAD P65, EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ARTROSIS EN CONEJO. | 63 |
| IV.1 Estudio de la O-GlcNAcización de la subunidad p65 de NF-κB. | 64 |
| IV.1.1 Estudio de la O-GlcNAcización de p65 en el citoplasma de los condrocitos. | 64 |
| IV.1.2 Estudio de la O-GlcNAcización de p65 en el núcleo de los condrocitos. | 65 |

| | |
|---|------------|
| V. DISCUSIÓN | 67 |
| I. ESTUDIO DE LA O-β-N-ACETILGLICOSILACIÓN EN LA ARTROSIS HUMANA. | 67 |
| I.A Estudio de la O-GlcNAcilación y su relación con la hipertrofia condrocitaria. | 69 |
| I.B Estudio de las enzimas OGT y OGA en la artrosis humana. | 70 |
| I.C Estudio de la localización de OGT en el cartílago humano. | 71 |
| I.D Estudio de la regulación del sistema O-GlcNAc en condrocitos artrósicos humanos estimulados con IL-1 α . | 72 |
| II. ESTUDIO DE LA O-β-N-ACETILGLICOSILACIÓN EN LA ARTROSIS EXPERIMENTAL. | 73 |
| II. A Estudio histopatológico y molecular de la articulación artrósica en el modelo experimental. | 74 |
| II.B Estudio del efecto del sulfato de glucosamina (SG) sobre la modulación del sistema O-GlcNAc, en el cartílago de los conejos artrósicos. | 75 |
| III. ESTUDIO DEL EFECTO DEL SULFATO DE GLUCOSAMINA (SG) SOBRE LA ACTIVIDAD DEL NF-κB A TRAVÉS DE LA O-GLCNAcilACIÓN DE P65, EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ARTROSIS EN CONEJO. | 78 |
| VI. CONCLUSIONES | 83 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 86 |
| ANEXO | 102 |

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En determinados casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

| | |
|----------------|---|
| ACR | American College of Rheumatology |
| AGES | <i>Advanced Glycosylation End-products</i> |
| AINES | Antiinflamatorios no esteroideos |
| BCA | Ácido bicinconínico |
| BMP | Proteínas morfogenéticas del hueso |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| C/EBP- β | Potenciador de unión proteica β |
| CIP | Cocktail de inhibidores de proteasas |
| COH | Condrocitos artrósicos humanos en cultivo |
| COX-2 | Ciclooxigenasa-2 |
| DAB | Cromógeno 3,3'-diamino-benzidina tetra-hidroclorado |
| DAMPs | Moléculas asociadas a patrones de daño |
| DMEM | Dulbecco Modified Eagle's Medium |
| EEM | Error Estimado de la Media |
| EMSA | Electrophoreti mobility shift assay |
| EtOH | Etanol absolute |
| GAGs | Glicosaminoglicanos |
| HIF-2 α | Factor inducido por hipoxia 2 α |
| HSB | High Salt Buffer; Solución alta en sales |
| IKB | Proteínas inhibidoras de KB |
| IKK | Complejo de kinasas de IKB |
| iNOS | Óxido nítrico sintasa inducible |
| IP | Inmunoprecipitación |

| | |
|-------------------|---|
| LCA | Ligamento Cruzado Anterior |
| LSB | Low Salt Buffer; Solución baja en sales |
| MCP-1 β | Proteína quimiotáctica del monocito 1- β |
| MEC | Matriz extracelular del cartílago |
| MIP-1 β | Proteína inflamatoria del monocito 1- β |
| MMP | Metaloproteasa |
| MS | Membrana sinovial |
| MP | Menisectomía parcial de la mitad anterior del menisco medial |
| mPGES-1 | Prostaglandina E sintasa microsomal 1 |
| NO | Óxido nítrico |
| NZ | Conejos albinos de raza Nueva Zelanda |
| NF- κ B | Factor de transcripción nuclear κ -B |
| O.N | Incubación durante la noche |
| OA | Artrosis |
| OE | Osificación endocondral |
| OGA | O-GlcNAcase = O-Linked β -N-Acetilglucosaminidasa |
| OGA _s | <i>Short</i> -OGA; Isoforma Corta de la enzima OGA (\approx 72 KDa) |
| OGA _L | <i>Long</i> -OGA; Isoforma Larga de la enzima OGA (\approx 130 KDa) |
| O-GlcNAc | <i>O-Linked</i> β -N-Acetilglucosaminación |
| O-GlcNAcilación | <i>O-Linked</i> β -N-Acetilglucosaminación |
| OGT | Uridina difosfo-N-acetilglucosamina : polipéptido β -N-acetilglucosaminil transferasa |
| OGT _m | <i>Mitochondrial</i> -OGT; Isoforma mitocondrial de la enzima OGT (\approx 103 KDa) |
| OGT _{nc} | <i>Nucleocytoplasmic</i> -OGT; Isoforma nucleocitoplásmica de OGT (\approx 116 KDa) |
| OGT _s | <i>Short</i> -OGT: Isoforma corta de la enzima OGT (\approx 70 KDa) |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OP | Osteoporosis |

| | |
|------------------|---|
| OPG | Osteoprotegerina |
| PA | Fosfatasa alcalina |
| PBS | Tampón fosfato |
| PGE ₂ | Prostaglandina E ₂ |
| PMSF | Phenil-metil-sulfonil-fluoride |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| r.p.m | Revoluciones Por Minuto |
| R.T | Temperatura ambiente |
| RUNX2 | Factor de transcripción <i>run-related-2</i> |
| SG | Sulfato de Glucosamina |
| sPLA2 | Fosfolipasa A2 soluble |
| STF | Suero de ternera fetal |
| SYSADOAS | Fármacos de acción lenta modificadores de los síntomas de la artrosis |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral α |
| TGF- β | Transforming growth factor β |
| U.A.D | Unidades Arbitrarias de Densitometría |
| UPS | Sistema de Ubiquitinación en Proteosoma |
| VEGF | Factor vascular de crecimiento endotelial |

I. INTRODUCCIÓN

1. LA ARTROSIS.

La artrosis (OA) es la causa más importante de dolor y discapacidad funcional en adultos mayores de 65 años (CDC 2010). En España, la mayor prevalencia de artrosis se encuentra entre el grupo de edades de 70 a 79 años. Se prevé que el aumento de la expectativa de vida y el envejecimiento de la población harán de la artrosis la cuarta causa de discapacidad en el año 2020 (Woolf AD 2003). Se trata por tanto, de una enfermedad con un elevado impacto socioeconómico que con seguridad aumentará en los próximos años. En la actualidad, no existe ningún tratamiento que revierta el deterioro articular en estos pacientes, o que al menos haga más lenta la evolución del mismo, y estos pacientes únicamente reciben un tratamiento sintomático en la mayor parte de los casos.

Tradicionalmente, la artrosis se ha descrito como una enfermedad degenerativa del cartílago. Esta definición sólo recoge una característica de la enfermedad. Sin embargo, durante la evolución de la artrosis, se producen alteraciones en todos los tejidos que forman parte de la articulación: cartílago, membrana sinovial, hueso subcondral, ligamentos, cápsula articular, etc (Revisado en (Loeser RF 2012)). Por este motivo, la artrosis es considerada una enfermedad de órgano en el que, independientemente de su origen y de las alteraciones que tengan lugar en el inicio de la misma, los eventos que describen una artrosis avanzada son comunes: pérdida de la estructura del cartílago, adelgazamiento y esclerosis del hueso subcondral, formación de osteofitos, sinovitis, degeneración de los ligamentos e hipertrofia de la cápsula articular (Revisado en (Castañeda S 2013)). Estos cambios afectan a toda la estructura de la articulación y provocan dolor, deformación y pérdida de la función articular (Pelletier JP 2001; Brandt KD 2006; Loeser RF 2006 ; Loeser RF 2012) (Figura 1).

La artrosis se ha clasificado tradicionalmente como primaria y secundaria, en función de si ocurre en una articulación sin daño previo aparente o si por el contrario, se origina por causas conocidas como trauma agudo, defectos anatómicos, etc (Arden N 2006). Se trata de una enfermedad heterogénea y de naturaleza multifactorial, en la que parece que el origen de la misma es desconocido y muy probablemente no es el mismo en todos los pacientes (Felson DT 2000; Arden N 2006; Samuels J 2008; Blagojevic M 2010). Probablemente, esta es la razón por la que no se ha avanzado gran cosa en el abordaje terapéutico de esta enfermedad. Nuestro grupo de investigación ha propuesto recientemente una nueva clasificación de lo que conocemos como artrosis primaria, con el fin de arrojar un poco de luz sobre los diferentes factores que podrían determinar el origen de la artrosis. Esta nueva visión, que está teniendo

bastante aceptación en la comunidad científica, tiene como objetivo distinguir diferentes fenotipos clínicos de la enfermedad que ayuden a acotar el origen de la misma, y que permitan una aproximación terapéutica más relacionada con la etiología de la enfermedad en cada paciente, en la medida de lo posible. Según esta propuesta, existirían tres fenotipos de enfermedad: Tipo I, relacionada con cambios en la síntesis de hormonas sexuales; tipo II, con un origen genético; y tipo III, asociada a la edad y el envejecimiento celular (Herrero-Beaumont G 2009). Estos diferentes fenotipos podrían además ir cambiando a lo largo del tiempo de evolución en cada paciente, a la vez que cambian las manifestaciones clínicas asociadas (Castañeda, 2013). Además de estos fenotipos que están asociados a eventos intra-articulares, el desarrollo de la artrosis está relacionado con determinados factores de riesgo extra-articulares o de carácter sistémico. Fundamentalmente, estos factores extra-articulares se asocian a la presencia de sobrecarga articular, obesidad, diabetes o síndrome metabólico (Figura 1). La obesidad contribuye al avance de la artrosis, no solo por la acción mecánica que ejerce el sobrepeso en las articulaciones de carga, además, los niveles de adipocinas circulantes se encuentran alterados en el organismo y afectan a las articulaciones que no son de soporte (Zhuo Q 2012). Se ha propuesto recientemente un fenotipo de artrosis denominado metabólico, asociado a una inflamación leve y sostenida, característica del síndrome metabólico y de otras enfermedades como la diabetes (Berenbaum F 2011; Herrero-Beaumont G 2011). Los factores de riesgo asociados a la artrosis, pueden afectar más a unos tejidos que a otros y a lo largo de la enfermedad la diana del daño artrósico puede variar, generando manifestaciones clínicas muy diversas. El daño puede afectar al hueso subcondral y se manifestará como una lesión en la médula ósea, en una imagen de resonancia magnética (Roemer FW 2009). Si el tejido más afectado es la membrana sinovial, predominará un fenotipo inflamatorio. En otros casos, donde las alteraciones de los tejidos sean más leves, la artrosis originará bursitis o tendinitis. La identificación de biomarcadores específicos en el suero o en la orina y las técnicas de imagen, podrían ser unas herramientas de gran utilidad en el diagnóstico precoz de la artrosis y además, ayudarían a determinar la zona articular más afectada, permitiendo así un tratamiento más focalizado y especializado en recuperar el tejido más afectado.

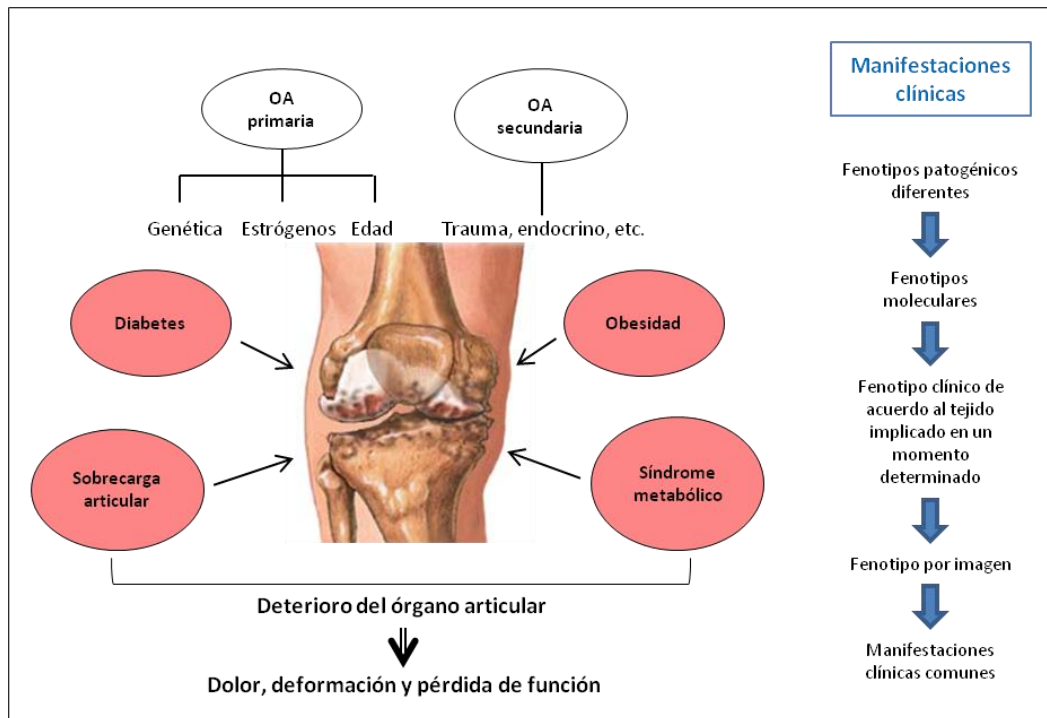


Figura 1. Representación esquemática de la artrosis como enfermedad de órgano. Factores intra-articulares y extra-articulares asociados a la evolución de la enfermedad. Esquema de la progresión clínica de la artrosis. OA: artrosis. (Castañeda S 2013).

1.1 El cartílago: Estructura y alteraciones durante la artrosis.

El cartílago articular es un tejido altamente especializado que confiere fuerza, flexibilidad y resistencia al sistema esquelético en áreas donde se requiere de una arquitectura semisólida. Es un tejido avascular, aneural y alinfático compuesto por un único tipo celular: el condrocito, rodeado de una matriz extracelular (MEC).

Los condrocitos suponen aproximadamente el 10% del peso total del tejido. Presentan un fenotipo estable, no proliferan y son los responsables de sintetizar y destruir los componentes que forman la (MEC) (Kirsch T 2000).

La MEC se compone de agua, colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas extracelulares. El colágeno es principalmente de tipo II y en pequeñas cantidades de tipo IV, IX, X y XI y confiere al cartílago una gran resistencia a la tensión. Los proteoglicanos son macromoléculas complejas resistentes a la compresión del cartílago, retienen gran cantidad de agua y son los responsables de la estructura porosa de este tejido. Están formados por glicosaminoglicanos

(GAGs), ácido hialurónico y proteínas. El último componente son las glicoproteínas extracelulares que mantienen a los condrocitos unidos a la MEC.

La estructura del cartílago articular adulto sano, consta de 4 capas que se distinguen por la morfología de los condrocitos y la organización estructural de la MEC (Figura 2.A):

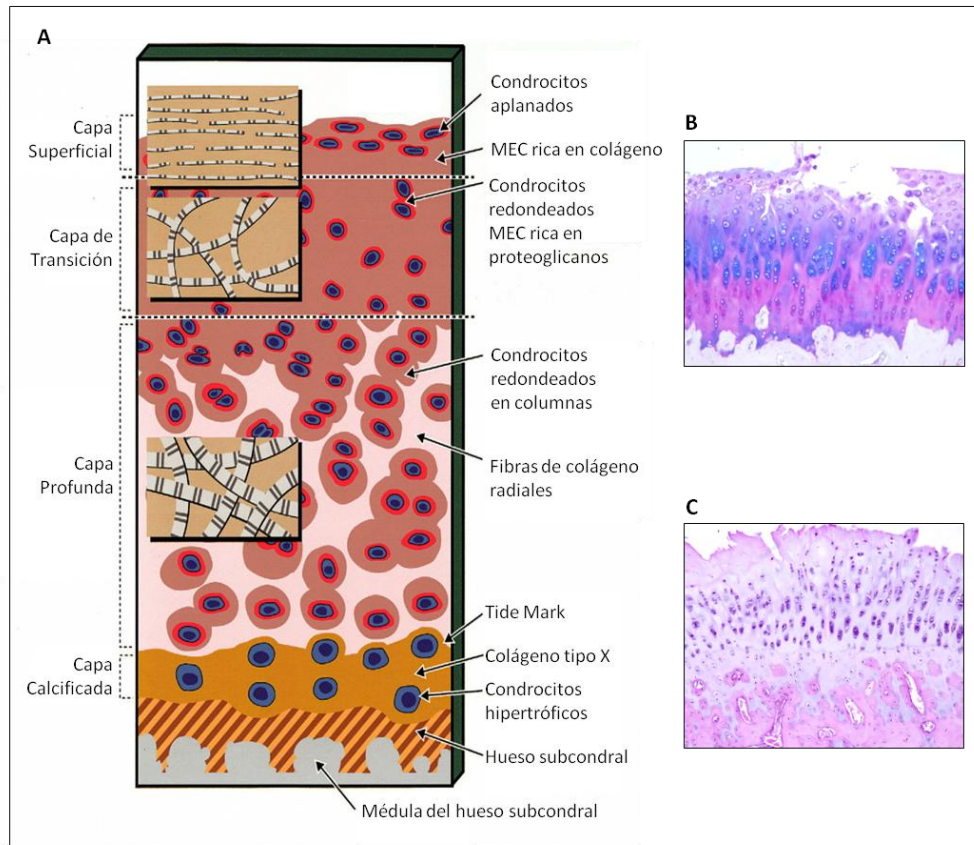


Figura 2. (A) Esquema de las capas del cartílago articular sano. (B y C) Imágenes microscópicas representativas del cartílago articular artrósico donde se aprecian los cambios que acontecen en el tejido dañado. Tinciones de azul alcian y hematoxilina-eosina, respectivamente.

1. La capa superficial, de unas 40 μm de espesor, con escasa actividad metabólica, pocos proteoglicanos y una elevada concentración de fibras de colágeno distribuidas en paralelo a la superficie. Los condrocitos presentan un fenotipo aplanado y se sitúan en paralelo a la superficie. Esta capa soporta las fuerzas de cizallamiento.
2. En la capa intermedia o de transición, de unas 500 μm de espesor, se detecta una mayor actividad metabólica así como mayor presencia de proteoglicanos. Las fibras de colágeno se ven reducidas y dispuestas de forma oblicua y al azar. Los condrocitos presentan un fenotipo más redondeado. Esta capa está diseñada para soportar fuerzas de compresión.

3. La capa profunda o radial, de 1000 μm de espesor, es responsable también de soportar las fuerzas de compresión. Es una capa rica en proteoglicanos y fibras de colágeno, que se distribuyen radialmente formando arcos. Los condrocitos presentan un fenotipo redondeado y se disponen en columnas.

4. La capa calcificada de unas 300 μm de espesor, carece de proteoglicanos y la celularidad es escasa. Los condrocitos de esta capa mantienen algunas propiedades de los condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento (Sintetizan fosfatasa alcalina y colágeno tipo X) (Kirsch T 2000). Contiene cristales de hidroxapatita y el colágeno está dispuesto radialmente. Es la capa adyacente al hueso subcondral que mantiene al cartílago anclado al hueso. La capa calcificada está separada de la capa profunda por el frente de calcificación o *tide mark* (Oegema TR Jr 1997). Es una barrera ondulada de unas 5 μm , cuyas fibras se disponen de manera tangencial y permite soportar las fuerzas de cizallamiento.

El cartílago articular adulto sano es una estructura estable, formada por condrocitos quiescentes y una MEC sometida a un recambio mínimo de sus componentes. En las articulaciones artrósicas, el cartílago experimenta cambios macroscópicos y microscópicos en todos los niveles. Las primeras alteraciones macroscópicas aparecen en la superficie, principalmente en zonas donde existe un fuerte estrés mecánico (Loeser RF 2012). La estructura del cartílago sufre una fibrilación superficial gradual, llegando a formar hendiduras que se pueden extender hasta el hueso subcondral. El grosor del cartílago disminuye de manera progresiva y en algunas zonas puede desaparecer completamente dejando expuesto el hueso. El deterioro del cartílago está acompañado por una deformación ósea y la aparición de osteofitos. En la fase más terminal de la artrosis las deformaciones estructurales conllevan finalmente a la sustitución de la articulación por una prótesis quirúrgica, como única alternativa (Figura 2.B y C).

El cambio estructural que sufre el cartílago artrósico repercute a nivel microscópico en la estabilidad de los condrocitos y estos responden activando un programa que recuerda al proceso de osificación endocondral: Proliferan, aumentan el remodelado de la MEC, se hipertrofian y calcifican el cartílago (Goldring MB 2009). En las primeras fases de la enfermedad los condrocitos se caracterizan por ser proliferativos, formar clones celulares y aumentar el remodelado de la matriz mediante la síntesis tanto de enzimas degradativas como de componentes de la MEC (Goldring MB 2009). Los condrocitos proliferativos expresan un programa genético - incluye la síntesis de la ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), la prostaglandina E sintasa microsomal 1 (mPGES-1), fosfolipasa A2 soluble (sPLA2) y Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) - que modula y potencia la respuesta inflamatoria y catabólica (Goldring MB

2004; Goldring SR 2004; Goldring MB 2009). Los condrocitos sintetizan y liberan citoquinas, quimioquinas y enzimas degradativas que actúan sobre la MEC (Pelletier JP 2001; Tetlow LC 2001; Wu W 2002; Goldring MB 2004; Goldring SR 2004; Abramson SB 2009). La degradación de la MEC, la llevan a cabo enzimas de la familia de las metaloproteinasas (MMP) tipo agregcanasas como la MMP-3 y ADAMTS-5; y colagenasas como la MMP-13 particularmente eficiente en la degradación del colágeno tipo II (van der Kraan PM 2008; Troeberg L 2012). En la MEC se encuentran almacenados factores de crecimiento (Proteínas morfogenéticas del hueso [BMP], factor de crecimiento transformante- β [TGF- β], etc.) que se liberan al degradarse la matriz y activan en los condrocitos un programa anabólico, a través del cual sintetizan principalmente colágeno de tipo II, otros tipos de colágeno VI, IX y XI y proteoglicanos (Loeser RF 2006) (Figura 3.A).

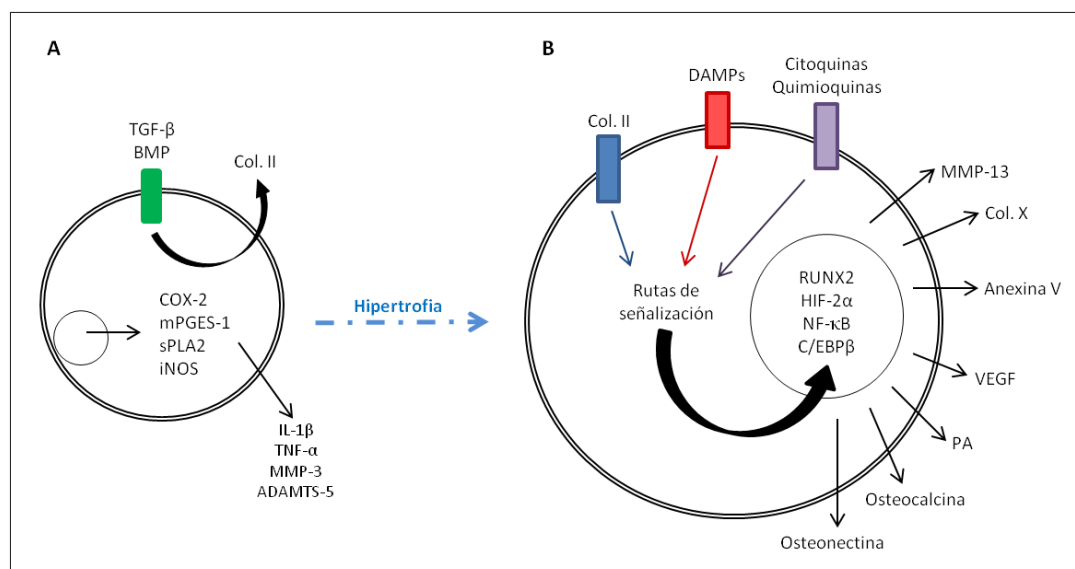


Figura 3. Selección de los factores implicados en el proceso de hipertrofia condrocitaria durante la artrosis. (A) El condrocito pre-hipertrófico, expresa un programa genético que modula la síntesis de mediadores inflamatorios y catabólicos. Recibe estímulos anabólicos y sintetiza componentes de la matriz. (B) En el condrocito hipertrófico, se activa la síntesis de moléculas que destruyen la matriz, vascularizan y mineralizan el cartílago. COX-2: cicloxigenasa-2; mPGES-2: prostaglandina E sintasa microsomal 1; sPLA2: fosfolipasa A2 soluble; iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible; BMP: Proteínas morfogenéticas del hueso; TGF- β : factor de crecimiento transformante- β ; Col. II: Colágeno tipo II; MMPs: metaloproteinasas; DAMPs: moléculas asociadas a un daño; IL-1 β : Interleuquina 1- β ; TNF- α : factor de necrosis tumoral- α ; RUNX2: factor de transcripción *run-related*-2; HIF-2 α : factor inducido por hipoxia 2 α ; C/EBP β : potenciador de unión proteica β ; NF- κ B: factor de transcripción nuclear κ B; VEGF: factor vascular de crecimiento endotelial; PA: fosfatasa alcalina.

En fases más avanzadas de la artrosis, el equilibrio del remodelado se desplaza de forma irreversible hacia la destrucción de la matriz y los condrocitos inician un proceso patológico de diferenciación hipertrófica (Figura 3.B). En la membrana de los condrocitos se localizan receptores que reconocen estímulos mecánicos - fragmentos de colágeno II, fibronectina, alarminas, moléculas asociadas a un daño (DAMPs) - e inflamatorios - citoquinas (Interleuquina 1- β [IL-1 β], factor de necrosis tumoral- α [TNF- α], etc.) y quimioquinas (CCL19, proteína quimiotáctica del monocito 1- β [MCP-1 β], proteína inflamatoria del monocito 1- β [MIP-1 β], etc.) - (Homandberg GA 1998; Pulai JI 2005; Fichter M 2006; Goldring MB 2009; Xu L 2010). Estas moléculas, desbloquean la diferenciación condrocitaria y activan un programa genético en los condrocitos, dirigido entre otros por el factor de transcripción *run-related-2* (RUNX2), el factor inducido por hipoxia 2 α (HIF-2 α), el potenciador de unión proteica β (C/EBP β) y el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) (revisado en (Loeser RF 2012)). Como consecuencia de este programa genético se incrementa la expresión de enzimas degradativas y mediadores inflamatorios. Los condrocitos se hipertrofian y aumentan la síntesis de MMP-13, colágeno tipo X y anexina V y VI, entre otros. Además expresan VEGF (factor vascular de crecimiento endotelial) que estimula la vascularización del cartílago mediante un proceso de neoangiogénesis desde el hueso subyacente (Rees JA 1988; Kirsch T 2000; Kawaguchi H 2009). Los condrocitos hipertróficos comienzan a depositar partículas que mineralizan la matriz, principalmente cristales de hidroxapatita y pirofosfatos (Ea HK 2011; Musacchio E 2011). Sintetizan fosfatasa alcalina (PA), osteocalcina y osteonectina que aumentan el grosor del cartílago calcificado y duplican e incluso triplican del frente de calcificación o *tide mark* (Kirsch T 2000; Kawaguchi H 2008; van der Kraan PM 2008; Kawaguchi H 2009). Finalmente los condrocitos entran en un programa de apoptosis en el que intervienen caspasas, la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un proceso de autofagia (D'Lima D 2006; Del Carlo M Jr 2008; Caramés B 2010). Este proceso, se ha estudiado en los últimos años como una consecuencia del deterioro de los tejidos por el paso del tiempo. La edad es un factor de riesgo para la artrosis que ha cobrado relevancia en la actualidad. El envejecimiento del cartílago está relacionado con la muerte de los condrocitos por procesos que implican la acumulación de ROS y productos finales de la glicosilación (AGEs; *Advanced glycation end products*)(Loeser RF 2012). Estos compuestos someten a los condrocitos a un estrés oxidativo creciente que se traduce en la activación patológica de la hipertrofia condrocitaria y facilitan el progreso de la enfermedad (Loeser RF 2006).

1.2 Otras estructuras articulares afectadas.

La artrosis afecta a la estructura y funcionalidad de todos los tejidos de la articulación. Los cambios patológicos más comunes incluyen la degradación del cartílago, un adelgazamiento del hueso subcondral, la formación de osteofitos, inflamación de la membrana sinovial, degeneración de los ligamentos e hipertrofia de la cápsula articular. Estos cambios afectan a toda la articulación y provocan dolor, deformación y pérdida de la función articular (Pelletier JP 2001; Brandt KD 2006; Loeser RF 2006 ; Loeser RF 2012).

El hueso subcondral se localiza adyacente al cartílago. Se extiende desde el frente de calcificación del cartílago hasta el inicio de la médula ósea. Durante la artrosis, experimenta un adelgazamiento como consecuencia de un incremento del remodelado óseo (Taljanovic MS 2008), acompañado de una disminución de la densidad mineral (Herrero-Beaumont G 2006). En este proceso participan el sistema RANK/RANKL/OPG (osteoprotegerina), MMPs y citoquinas (IL-6, IL-8, etc.), producidos tanto en el hueso subcondral como en el cartílago. Estos factores difunden entre ambos tejidos y participan en el remodelado del hueso subcondral y en la destrucción del cartílago (Kwan Tat S 2009; Moreno-Rubio J 2010; Bellido M 2010). Además, ambos tejidos sintetizan VEGF que estimula la invasión de los vasos sanguíneos del hueso subcondral hacia el cartílago (Rees JA 1988; Kirsch T 2000; Kawaguchi H 2009).

Los cambios estructurales que ocurren en la membrana sinovial artrósica implican una hiperplasia moderada de la capa íntima, edema intersticial, incremento de la vascularización, activación de las células resistentes del estroma e infiltrado de la membrana sinovial por células inflamatorias, incluyendo células B y T activadas (Saito I 2002). La membrana sinovial artrósica sintetiza y libera mediadores inflamatorios (IL-1 β , IL-15, TNF- α , CCL19, MCP-1, etc.) y mecánicos (alarminas, DAMP, fibronectina, etc.) que estimulan a los condrocitos a entrar en el programa de diferenciación hipertrófica (Homandberg GA 1998; Pulai JI 2005; Fichter M 2006; Goldring MB 2009; Xu L 2010; Loeser RF 2012).

Otra alteración estructural que se da en las articulaciones artrósicas es la formación de osteofitos en los márgenes articulares. Estas estructuras se forman por un proceso de osificación endocondral similar al que ocurre durante el desarrollo y el crecimiento del esqueleto (van der Kraan PM 2007). El cartílago, la membrana sinovial y el hueso subcondral artrósicos liberan factores de crecimiento (TGF- β y BMP-2, principalmente) que estimulan la formación de osteofitos.

2. NUEVOS MECANISMOS DE DAÑO CELULAR EN EL CONDROCITO: LA GLICOSILACIÓN.

Es cada vez mayor el conocimiento que se tiene a cerca de los procesos moleculares que ocurren en el condrocito durante el desarrollo de la artrosis. Sin embargo, no existe ningún tratamiento capaz de modular, frenar o revertir los cambios que se producen en la célula. Los condrocitos artrósicos de manera irreversible entran en un programa de diferenciación hipertrófica que desencadena la cascada de mediadores inflamatorios y catabólicos que destruyen el cartílago. Por este motivo se hace imprescindible la exploración de otros mecanismos celulares que puedan constituir una futura diana terapéutica para la artrosis.

En los últimos años ha cobrado relevancia la regulación de la homeostasis nutricional y metabólica como factor de riesgo para el desarrollo de la artrosis. La sensibilidad y la capacidad de responder de las células ante fluctuaciones nutricionales en el entorno, son dos características imprescindibles para la viabilidad celular (Rolland F 2001). En las articulaciones, los compuestos nutricionales están implicados en múltiples mecanismos biológicos y pueden influir en la función y fisiopatología articular en enfermedades como la artrosis (McAlindon TE 2006). En el cartílago la disponibilidad de nutrientes como la glucosa y otras hexosas, es esencial para la síntesis de colágeno, proteoglicanos y GAGs (Clark AG 2002; Mobasheri A 2002; McNulty AL 2005). El metabolismo de la glucosa en concreto, es de gran interés en el cartílago por ser el precursor estructural mayoritario de las macromoléculas que forman la MEC y el combustible metabólico necesario para la obtención de energía en este tejido. Hoy en día sabemos que el nivel de glucosa extracelular condiciona la actividad de los condrocitos, que adaptan su programa genético y metabólico en respuesta a las variaciones en la concentración de glucosa en el medio (Rosa SC 2011). La absorción de glucosa en los condrocitos se lleva a cabo a través de los receptores de azúcares de la familia GLUT/SLC2A - entre otros, el receptor GLUT1 - y su expresión está regulada por condiciones de hipoxia, IGF-1 (factor de crecimiento *insulin-like-1*) y por citoquinas inflamatorias (Revisado en (Mobasheri A 2012)). Los condrocitos son capaces de adaptarse a condiciones altas y bajas de glucosa mediante la síntesis o la degradación del receptor GLUT1 (Rosa SC 2009). Sin embargo, los condrocitos artrósicos no son capaces de regular la expresión del receptor y en condiciones de hiperglicemia, acumulan glucosa en su interior y disparan la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS), que contribuyen a la patogenia de la artrosis (Rolo AP 2006). Además, ya en los años 90 se observó que la absorción de glucosa por parte de los condrocitos, se estimulaba con citoquinas proinflamatorias características de la artrosis y se inhibía utilizando cortisol anti-inflamatorio (Hernvann A 1992; Hernvann A 1996). Estos resultados ponen de manifiesto

el papel del metabolismo de la glucosa en el desarrollo de la artrosis. Son cada vez más los estudios que señalan la hiperglicemia, que se da en situaciones patológicas con desórdenes en el metabolismo de la glucosa, como es el caso de la diabetes, como un factor de riesgo importante en la progresión de la artrosis (Mobasheri A 2012). El efecto tóxico local (por la acumulación de productos de glicosilación avanzada [AGE, por *Advanced Glycosylation End-products*] y la inducción de ROS) y sistémico (por la inducción moderada de mediadores Inflamatorios y del deterioro neuromuscular), causado por la hiperglicemia asociada a la diabetes, tiene como consecuencia un proceso de inflamación leve y sostenida, que afecta a la articulación y da lugar al deterioro de la MEC, la alteración de la calidad del hueso subcondral y la activación de factores pro-inflamatorios y enzimas degradativas, en los condrocitos y sinoviocitos, entre otros efectos (Berenbaum F 2011).

La concentración de glucosa en el organismo determina, entre otros procesos, la glicosilación de proteínas (Figura 4.A). La glicosilación es fundamental en la naturaleza y de hecho más del 50% de las proteínas conocidas son susceptibles de glicosilarse (Apweiler R 1999). En la especie humana las proteínas que conforman la maquinaria de la glicosilación se cuentan por centenas y el 1% del genoma está dedicado a codificarlas (Freeze HH 1998). Se trata de una de las modificaciones postraduccionales más importantes para la célula, que va a determinar la estructura, función y localización de las proteínas sometidas a este proceso (Varki A 1993). La glicosilación permite aumentar la solubilidad e incrementar la vida media de las proteínas y está relacionada con funciones tan relevantes como el reconocimiento y soporte celular, el desarrollo de tejidos o la señalización extracelular (Varki A 1993).

Tradicionalmente la glicosilación se ha clasificado en dos tipos: glicosilación enzimática y no enzimática. El primero de ellos, consiste en la adición de monosacáridos a las cadenas laterales de los aminoácidos. Es un proceso localizado en el retículo endoplásmico (RE) y en el aparato de Golgi (AG), mediado por enzimas glicosil-transferasas y específico de tejido, de especie e incluso dependiente del estado celular. Requiere de la formación inicial de polisacáridos complejos que posteriormente se unen por medio de enlaces covalentes a las proteínas (Beas C 2009). Se conocen dos tipos de glicosilación enzimática: la N-glicosilación que ocurre sobre residuos de asparragina (Asn) en secuencias consenso (Helenius J 2002; Freeze HH 2005); y la O-glicosilación que ocurre en residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) y se produce únicamente en el AG (Wopereis S 2006).

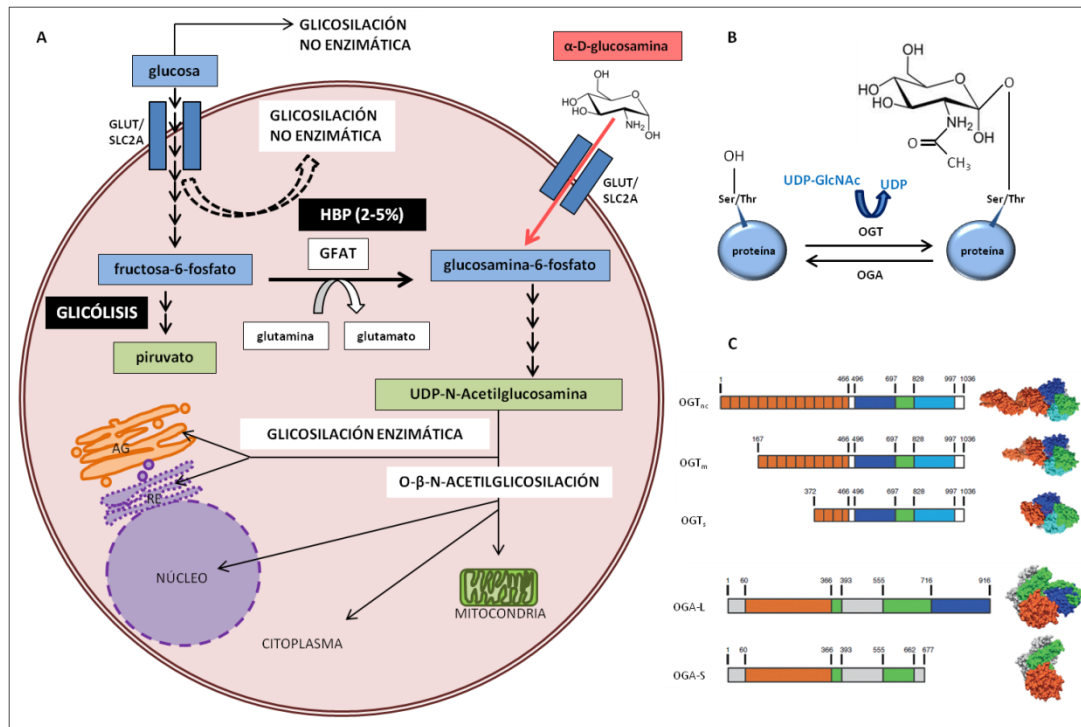


Figura 4. (A) Esquema del metabolismo de la glucosa. (B) Esquema del proceso de O- β -N-acetilglucosilación de proteínas. (C) Representación esquemática de las isoformas de las enzimas implicadas en el sistema de O- β -N-acetilglucosilación: OGT y OGA (Vocablo DJ 2012). GLUT/SLC2A = receptores de membrana de glucosa; HBP = ruta de biosíntesis de las hexosaminas (*Hexosamine Biosynthesis Pathway*); GFAT = enzima L-glutamina-D-fructosa-6-fosfato amidotransferasa; UDP-GlcNAc = Uridín di-fosfato N-acetilglucosamina; AG = aparato de Golgi; RE = retículo endoplásmico; Ser = aminoácido serina; Thr = aminoácido treonina; OGT = uridina difosfo-N-acetilglucosamina:polipéptido β -N-acetilglucosaminil transferasa; OGA = β -N-acetilglucosaminidasa; OGT_{nc} = isoforma de OGT nucleocitoplásmica; OGT_m = isoforma mitocondrial; OGT_s = isoforma corta o *short*; OGA-L = isoforma de OGA larga; OGA-S = isoforma corta o *short*.

El segundo tipo de glicosilación, en el que no interviene ninguna enzima, se descubrió en 1912 y se denominó reacción de Maillard en honor a su descubridor (Maillard L.C 1912). Es un proceso espontáneo de unión entre un azúcar reductor con un grupo carbonilo libre y una proteína. El azúcar reductor más abundante en el organismo y el más estudiado por su interés biológico es la glucosa. Los niveles de glucosa en el organismo y la vida media de las proteínas regulan este tipo de glicosilación no enzimática que consta de tres etapas (F. Luis González Flecha 2000; Luevano-Contreras C 2010): 1) formación de la base de Schiff, 2) formación del producto de Amadori y 3) formación de los productos de glicosilación avanzada (AGEs). La formación de la base de Schiff consiste en la unión espontánea del grupo carbonilo libre de la glucosa con un grupo amino de la proteína. Esta etapa se inicia con unos niveles de glucosa determinados y el resultado es un producto poco estable que dura unas horas. Transcurrido este tiempo comienzan a ocurrir oxidaciones, reducciones e hidrataciones que dan lugar a la formación de un producto más estable y que dura algunas semanas, el producto de Amadori

(Lee AT 1992). Las dos primeras etapas son consecutivas y reversibles. Un descenso del nivel de glucosa interrumpe el contacto del azúcar con la proteína y revierte ambas etapas. La reacción se hace irreversible al producirse reordenamientos intramoleculares e incluso la asociación entre varios compuestos que dan lugar a productos altamente reactivos y muy estables (Reynolds TM 1963). Estos compuestos interaccionan con proteínas de vida media larga, como el colágeno, la hemoglobina o la albúmina (Méndez JD 2010) y originan una serie de productos denominados genéricamente productos de glicosilación avanzada (AGE, por *Advanced Glycosylation End-products*) (Brownlee M 1984; Vlassara H 1984; Ahmed N 2005).

Durante más de 50 años, el avance en el conocimiento químico de la reacción de Maillard estuvo directamente vinculado con la ciencia y la tecnología de los alimentos, debido a que este tipo de glicosilaciones espontáneas eran las responsables de dar color y sabor a determinados alimentos. Este proceso cobró relevancia para la fisiología humana, cuando Koenig y colaboradores descubrieron en 1976 unos niveles de hemoglobina glicosilada en la sangre de individuos diabéticos proporcionalmente más elevados que en los individuos sanos (Koenig RJ 1976). Actualmente está siendo muy estudiado por la implicación de los AGEs en enfermedades crónicas (Luevano-Contreras C 2010) como el Alzheimer (Cruz-Sánchez FF 2010), la diabetes (Peppas M 2009), enfermedades cardiovasculares (Semba RD 2009; Nishizawa Y 2012) y el envejecimiento (Peppas M 2008). Los AGEs provocan efectos deletéreos en los tejidos como consecuencia de su actividad química, pro-oxidativa e inflamatoria. Los AGEs estimulan a las células a través de unos receptores específicos (RAGEs) que reconocen estos compuestos y activan la ruta de señalización intracelular mediada por las MAPKs y la fosfatidilinositol-3-fosfato kinasa (PI3-K) (Sheetz MJ 2002; Ahmed N 2005). Además, la interacción AGE-RAGEs incrementa el estrés oxidativo en la célula (Bierhaus A 2005; Lukic IK 2008). La ruta de señalización mencionada junto con el incremento del estrés oxidativo, modulan la actividad del NF- κ B que induce la expresión de factores inflamatorios (Lin L 2009).

Existe un tercer tipo de glicosilación que comprende características de las dos primeras y que resulta difícil encuadrarla en una u otra. Se trata de la O- β -N-acetilglicosilación (O-GlcNAcilación) de proteínas. Este proceso está únicamente regulado por dos enzimas, ocurre en el citoplasma, núcleo y mitocondria celular, depende del estado nutricional de la célula y es dinámico y reversible.

2.1 La O- β -N-Acetilglicosilación (O-GlcNAcilación) de proteínas.

La O-GlcNAcilación de proteínas fue descrita por primera vez en 1984 por Torres y Hart (Torres CR 1984) y desde entonces se han descubierto más de 3.000 proteínas nucleares, citoplásmicas y mitocondriales O-GlcNAciladas, pertenecientes a diversos grupos funcionales. Se trata de un tipo de glicosilación postraducciona reversible, que consiste en la adición de un único residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) mediante un enlace éster, en las serinas (Ser) y/o treoninas (Thr) de las proteínas (Figura 4.B) (Torres CR 1984; Holt GD 1986; Haltiwanger RS 1990). La reacción tiene lugar en el núcleo, citoplasma y mitocondrias celulares, nunca en el RE o AG como sucede con la glicosilación tradicional (Figura 4.A). El grupo donador de la reacción es el producto final de la ruta de las hexosaminas (*Hexosamine Biosynthesis Pathway*: HBP), el UDP-GlcNAc y está catalizada únicamente por dos enzimas: la uridina difosfo-N-acetilglucosamina:polipéptido β -N-acetilglucosaminil transferasa (OGT) y la β -N-acetilglucosaminidasa (OGA) (Torres CR 1984; Holt GD 1986; Haltiwanger RS 1990; Haltiwanger RS 1992; Gao Y 2001; Hanover JA 2001; Wells L 2001; Vosseller K 2002; Whelan SA 2003; Slawson C 2006) (Figura 4.C). El nivel de O-GlcNAc está regulado principalmente por cinco factores: (1) la expresión y actividad de OGT, (2) la expresión y actividad de OGA, (3) la concentración de UDP-GlcNAc, (4) la disponibilidad de las proteínas y (5) la afinidad de las enzimas por las proteínas (Revisado en (Groves JA 2013)).

La O-GlcNAcilación, es un proceso de gran interés científico por su relevancia en la homeostasis celular. La delección de OGT, OGA o de cualquier enzima limitante de la HBP es letal en mamíferos (Yang YR 2012). Los cambios en el nivel de O-GlcNAc repercuten en la supervivencia celular y sabemos por la literatura que dichos niveles, responden a estímulos intracelulares y extracelulares como la insulina, la concentración de nutrientes y el estrés celular (Kearse KP 1991; Zachara NE 2004 b; Song M 2008; Whelan SA 2008; Whelan SA 2010; Hart GW 2011). Se ha demostrado que los cambios en la concentración de glucosa extracelular modulan la función de algunas proteínas mediante la alteración de la O-GlcNAcilación (Zachara NE 2004 a; Butkinaree C 2010). Además, otros nutrientes como los ácidos grasos libres, incrementan el flujo de la HBP, lo que se traduce en un aumento de los niveles de O-GlcNAc (Hawkins M 1997). Estos y otros datos, nos permiten definir la O-GlcNAcilación como un sensor nutricional capaz de adaptar a la célula a las condiciones nutricionales cambiantes del entorno.

2.1.1 La Ruta de las Hexosaminas (*Hexosamine Biosynthesis Pathway*: HBP).

La HBP es la vía celular por la cual se metaboliza entre un 2% y un 5% de la glucosa total que entra en la célula (Marshall S 1991) y se transforma mediante el proceso de glicosilación en macromoléculas estructurales (Figura 4.A). La glucosa se transforma en fructosa-6-fosfato (Fructosa-6-P) y ésta en glucosamina-6-fosfato (GlcN-6-P) a través de la enzima L-glutamina-D-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT), que utiliza la glutamina como donador del grupo amino (Kornfeld R 1967) y es el primer factor limitante de la ruta HBP (Marshall S 1991). La GlcN-6-P se convierte en uridin difosfato N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) que va a ser el sustrato de numerosas reacciones de glicosilación, entre ellas la O-GlcNAcilación de proteínas (Dias WB 2007; Chatham JC 2008). La concentración de UDP-GlcNAc en la célula, es el segundo factor limitante de la ruta HBP y está determinada por tres factores: (1) la enzima GFAT cuya sobreexpresión incrementa los niveles de UDP-GlcNAc (Hazel M 2004); (2) la disponibilidad de nutrientes, principalmente glucosa, ácidos grasos, aminoácidos y nucleótidos, que regulan el flujo de la HBP (Zachara NE 2004 a); y (3) los niveles de UDP-GlcNAc a través de un proceso de retroalimentación negativa, que inhibe la enzima GFAT cuando UDP-GlcNAc se encuentra en exceso en la célula (Marshall S 2004). La concentración de UDP-GlcNAc es uno de los factores de modular el proceso de O-GlcNAcilación de proteínas y que confieren a este sistema la cualidad de sensor nutricional.

2.1.2 Proteínas modificadas por el proceso de O-GlcNAcilación.

Desde que se descubrió el sistema de O-GlcNAcilación, se han descrito numerosas funciones proteicas reguladas por este proceso entre las que se incluyen: La unión a DNA y la transactivación (Jackson SP 1989; Comer FI 1999; Gao Y 2003; Sayat R 2008; Ozcan S 2010), las interacciones proteína-proteína (Guinez C and T 2010; Ise H and Ikeda U 2010; Lim K 2010), degradación proteica (Han I 1997; Cheng X 2001; Zhang F 2003), actividad proteica y enzimática (Zhang F 2003; Kim YH 2006; Rengifo J 2007; Dias WB 2009; Bimboese P 2011), localización (Dudognon P 2004; Sayat R 2008) y otras muchas (Hart GW 2011).

Entre las proteínas O-GlcNAcizadas se incluyen: factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, ribosomales, proteosómicas, asociadas a la cromatina, histonas y proteínas

señalizadores como kinasas y enzimas metabólicas (Wells L 2002; Wells L 2003; Whelan SA 2003; Khidekel N 2004; Zachara NE 2004 a; Love DC 2005; Davidoff AJ 2006; Vosseller K 2006; Zachara NE 2006; Wang Z 2007; Gurcel C 2008; Rexach JE 2008; Carapito C 2009; Teo C 2010). La O-GlcNAcilación regula la función (Kudlow JE 2006), la actividad (Federici M 2002), la localización celular (Duverger E 1996; Golks A 2007; Yang X 2008) y la estabilidad (Han I 1998; Zhang F 2003) de las proteínas de manera análoga al proceso de fosforilación. De hecho la O-GlcNAcilación y la fosforilación proteica mantienen una estrecha relación. Existe un intercambio dinámico entre la incorporación de residuos de O-GlcNAc y la fosforilación proteica. Los residuos proteicos que se O-GlcNAcilan son casi siempre susceptibles de fosforilarse, de tal manera que las enzimas implicadas en ambos procesos compiten por la modificación de estos residuos. Así ocurre con la modificación postraducciona de la enzima iNOS, c-myc, el receptor β de estrógenos o la ubiquitina (Cheng X 2000; Du XL 2001; Kamemura K 2002). Esta relación no es excluyente ya que algunas proteínas pueden estar a la vez fosforiladas y O-GlcNAciladas. Esta relación de convivencia *versus* competencia entre ambos procesos, está implicada en la modulación de mecanismos celulares cruciales (Slawson C 2006; Zachara NE 2006).

El mecanismo por el cual la O-GlcNAc modula la función de las proteínas no se conoce con exactitud pero se ha relacionado con rutas de señalización como la ruta PI3K/Akt, la expresión de *heat shock proteins* (HSP), la homeostasis del calcio, la producción de ROS o la inflamación (Groves JA 2013).

2.1.3 Las enzimas de la O-GlcNAcilación proteica.

- OGT (uridina difosfo-N-acetilglucosamina:polipéptido β -N-acetilglucosaminil transferasa)

OGT (Figura 4.C) es la única glicosiltransferasa encontrada capaz de catalizar de forma reversible la O-GlcNAcilación de proteínas nucleares, citoplásmicas y mitocondriales, mediante la incorporación residuos O-GlcNAc, utilizando como grupo donador UDP-GlcNAc (Torres CR 1984; Holt GD 1986; Haltiwanger RS 1990; Haltiwanger RS 1992). Se trata de una proteína soluble, que se expresa en todos los tejidos hasta ahora estudiados y muy conservada filogenéticamente (Haltiwanger RS 1992; Lubas WA 1997; Hanover JA 2003; Kreppel LK 1997).

La actividad de OGT está regulada por la concentración de UDP, UDP-GlcNAc y por otras modificaciones postraduccionales. OGT se auto-O-GlcNAcila y además se fosforila (Kreppel LK 1999; Lubas WA 2000). Se ha demostrado que los cambios en la concentración y el metabolismo de la glucosa, repercuten en el flujo de la ruta HBP y esto altera la actividad de OGT (Zachara NE 2006; Fülöp N 2007).

OGT está codificada en humano y en ratón, por un único gen localizado en el cromosoma X (Xq13.1) (Nolte D 2002; Hanover JA 2003; Kreppel LK 1997). Tiene dos dominios funcionales: el extremo N-terminal formado por dominios tetratricopéptidos repetidos (dominios TPR) y el extremo C-terminal catalítico que pertenece a la superfamilia de las glicogen-fosforilasas (Lubas WA 1997; Wrabl JO 2001; Kreppel LK 1997). Se han descrito tres isoformas de OGT que se originan por splicing alternativo, con diferentes dianas y actividades dirigidas hacia varios sustratos (Nolte D 2002). Las diferentes isoformas se diferencian en el número de tetratricopéptidos repetidos en el extremo N-terminal de la molécula y presentan diferentes localizaciones subcelulares (Hanover JA 2003) (Figura 4.C). La isoforma más pesada (116 KDa) se encuentra en el núcleo y en el citoplasma (OGT nucleocitoplásmica; OGT_{nc}). La siguiente en peso molecular (103 KDa), es la conocida como OGT mitocondrial (OGT_m) por su localización. Finalmente, la isoforma descrita como Short-OGT (OGT corta; OGT_s) de aproximadamente 70 KDa, cuya localización no está determinada (Lubas WA 1997; Hanover JA 2003; Zachara NE 2004 a; Lazarus BD 2009; Butkinaree C 2010; Lefebvre T 2010; Voadlo DJ 2012; Kreppel LK 1997).

- OGA (β -N-acetilglucosaminidasa).

OGA (Figura 4.C) es también una enzima soluble y muy ubicua que actúa en el citoplasma celular eliminando el residuo de GlcNAc de las proteínas O-GlcNAcizadas (Dong DL 1994; Wells L 2002). El gen que codifica la enzima OGA, se identificó en 1998 como *meningioma-expressed antigen 5* (*mgea5*) y a la proteína se la definió como una enzima hialuronidasa. Fue en 2001, cuando estudios más profundos revelaron que dicha hialuronidasa era en realidad la OGA bioquímicamente caracterizada por Dong y Hart en 1994 (Comtesse N 2001; Gao Y 2001). OGA está fosforilada y O-GlcNAcizada, pero no se conoce la función que desempeña esta modificación en la enzima (Gao Y 2001; Wells L 2002).

Son dos las isoformas descritas de OGA (Vocadlo DJ 2012) (Figura 4.C). La isoforma de mayor peso molecular (130 KDa) Long-OGA (OGA larga; OGA_L) y la de menor peso molecular (75 KDa) Short-OGA (OGA corta; OGA_S) (Kim EJ 2007; Lefebvre T 2010). La isoforma OGA_L presenta actividad O-GlcNAcase en el extremo N-terminal y actividad acetiladora de histonas en el extremo C-terminal. Sin embargo, para la isoforma OGA_S sólo se ha descrito actividad acetilasa de histonas (Lefebvre T 2010).

2.2 Fisiopatología de la O-GlcNAcilación de proteínas.

Las células están capacitadas para responder ante un daño mediante la modificación de su metabolismo, de la actividad de transcripción y traducción proteica y de la señalización intracelular. El conjunto de estos cambios se conoce como respuesta celular inducida por estrés (Lindquist S 1986; Nollen EA 2002). Recientemente se ha definido la O-GlcNAcilación como un componente de la respuesta celular frente al estrés. Es por ello que cualquier alteración en el sistema de O-GlcNAc, afecta directamente a la supervivencia celular y tiene efectos deletéreos en los tejidos (Zachara NE 2004 a; Love DC 2005; Slawson C 2006; Zachara NE 2006).

La literatura recoge dos tipos de alteraciones en el sistema de O-GlcNAc que van a dar lugar a respuestas celulares muy diferentes. Se trata de alteraciones transitorias o por el contrario, crónicas. En el caso de las primeras, son varios los autores que describen el incremento transitorio como un mecanismo protector para la célula. Se ha demostrado que después de un daño agudo, el incremento del nivel de proteínas O-GlcNAcizadas aumenta la tolerancia celular frente al estrés (Zachara NE 2004 b; Yang WH 2006) y mejora la supervivencia celular y la recuperación funcional de los tejidos dañados - como se describe en el modelo de daño cardíaco por isquemia-reperfusión (I/R) descrito por Champattanachai y Liu en el mismo año - (Champattanachai V 2007; Liu J 2007). Por el contrario la inhibición del sistema de O-GlcNAc disminuye la supervivencia celular (Zachara NE 2004 b; Groves JA 2013).

En contraste con el beneficio asociado a elevaciones transitorias, las alteraciones crónicas en los niveles de proteínas O-GlcNAcizadas, se han asociado con la patogénesis de enfermedades degenerativas como la diabetes y sus complicaciones (Chou TY 1995; Zachara NE 2004 a; Love DC 2005; Buse MG 2006; Dias WB 2007), enfermedades cardiovasculares (Jones SP 2008; Laczy B 2009), cáncer (Chou TY 1995), alzhéimer y otras enfermedades neurodegenerativas (Hanover

JA 2001; Wells L 2003; Lefebvre T 2005; Love DC 2005; Dias WB 2007) y con el envejecimiento (Rex-Mathes M 2001; Fülöp N 2007; Fülöp N 2008). Así, la O-GlcNAcilación de c-myc participa en la transformación neoplásica celular (Zou L 2009). Otros estudios en músculo y tejido graso, han demostrado que la sobre-expresión de OGT provoca resistencia a insulina e hiperleptinemia y la inhibición específica de OGA causa diabetes experimental (Rex-Mathes M 2001). Por lo tanto, según lo descrito en la literatura, el incremento crónico de la O-GlcNAcilación de proteínas en las enfermedades mencionadas, no es un epifenómeno sino un verdadero factor patogénico etiopatogénico.

3. EL SULFATO DE GLUCOSAMINA (SG) Y LA MODULACIÓN DE LA O- β -N-ACETILGLICOSILACIÓN PROTEICA.

El sulfato de glucosamina (SG) es un potente acelerador de la ruta HBP y regulador del sistema O-GlcNAc (Champattanachai V 2007; Fülöp N 2007; Liu J 2007; Champattanachai V 2008). Esta característica se debe a que el SG absorbido por la célula, entra directamente a la ruta HBP (Yki-Järvinen H 1998). La molécula Interacciona con los receptores de glucosa (GLUT) y una vez dentro de la célula es transformada directamente en glucosamina-6-P, que continúa metabolizándose hasta obtener el producto final de la ruta HBP, el UDP-GlcNAc (Figura 4.A) (Marshall S 1991; H. Chen 1997; Yki-Järvinen H 1998). El SG alimenta el flujo de la HBP y de esta manera incrementa la concentración del UDP-GlcNAc (Vosseller K 2002; Marshall S 2004). Sabemos por la literatura, que el flujo de la ruta HBP y los niveles de UDP-GlcNAc en la célula, son un factor clave en la regulación de la O-GlcNAc (Zachara NE 2004 a; Butkinaree C 2010). Recientemente se ha demostrado, que el SG es capaz de incrementar el nivel de O-GlcNAc a través del flujo de la ruta HBP (Zou L 2007).

Son varios los autores que definen la acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas como un mecanismo de protección celular. Se ha demostrado que ante un daño agudo, las células responden con un incremento en el nivel de O-GlcNAc, que modula la respuesta celular de supervivencia o respuesta frente al estrés celular, a través de la ruta de señalización PI3K/AKT, las HSP, la homeostasis del calcio, la producción de ROS o la inflamación, entre otros (Groves JA 2013). Puesto que el SG promueve la acumulación de O-GlcNAc en la célula, se ha estudiado su papel en la respuesta frente al estrés celular. Son varios los trabajos que relacionan un incremento de los niveles de O-GlcNAc inducido por el SG, con la atenuación de la cascada pro-

inflamatoria mediada por NF- κ B (Yang S 2006; Zou L 2007; Zou L 2009). El mecanismo por el cual el SG media en la respuesta frente al estrés, no se conoce en profundidad, pero queda demostrado a través de la literatura publicada al respecto, que la modificación del flujo de la ruta HBP por el SG, modula la O-GlcNAcilación de proteínas y modifica la actividad de factores tan relevantes en la respuesta celular frente al estrés como el NF- κ B, convirtiendo al SG en un factor de protección celular y tisular (Xing D 2011).

El SG en el ámbito de las enfermedades reumáticas, es un fármaco que ha generado mucha controversia en cuanto a su eficacia en el tratamiento contra la artrosis (Burdett N 2012). Es una amino-monosacárido esencial para la síntesis de glicolípidos, glicoproteínas y GAG, que componen los tejidos conectivos y que confieren fuerza, flexibilidad y elasticidad (Wang SX 2007). Forma parte de la familia de los fármacos conocidos como SYSADOAS (por *Symptomatic slow-acting drugs for osteoarthritis*; fármacos de acción lenta modificadores de los síntomas de la artrosis) y su efecto, en cuanto a la reducción del dolor y la mejora de la función articular, se observa unas semanas después del inicio del tratamiento (Uebelhart D 2008). Los SYSADOAS, entre los que se incluyen compuestos como la N-Acetil Glucosamina (AcG), Condroitín Sulfato (CS), Diacereína (DC), Ácido Hialurónico, Hidrocloruro de Glucosamina (HG) o el Sulfato de Glucosamina (GS), se empezaron a utilizar en un intento por recomponer la MEC del cartílago (Fajardo M 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos en diferentes estudios, no han sido siempre positivos y por eso su papel como agentes modificadores de la artrosis está en entredicho (Dougados M 2001; Richy F 2003; Hochberg MC 2006).

El SG, ha sido estudiado como fármaco contra la artrosis en diferentes ensayos clínicos, en modelos animales o en estudios *in vitro* y los resultados obtenidos han generado seguidores y detractores en cuanto a su utilización (Burdett N 2012; Sherman AL 2012).

Los ensayos clínicos realizados en pacientes artrósicos, evalúan el dolor, la función articular y la pérdida de cartílago. Los resultados de dos ensayos multicéntricos, los estudios GAIT (Clegg DO 2006) y GUIDE (Herrero-Beaumont G 2005), y otros estudios realizados en pacientes con artrosis de rodilla, sugieren un efecto beneficioso del SG, en cuanto al control del dolor y a las anomalías estructurales asociadas a la artrosis (Reginster JY 2001; Pavelká K 2002; Richy F 2003; Herrero-Beaumont G 2007; Nakamura H 2007). Sin embargo, los efectos beneficiosos en estos ensayos, solo se han podido demostrar en enfermos con artrosis leve o moderada. De hecho, otros autores sugieren que el SG no es un tratamiento eficaz contra el dolor o el deterioro del cartílago, en los casos de artrosis severa (Hughes R 2002; Poolsup N 2005; Sawitzke AD 2008).

Los diferentes estudios *in vitro* realizados con SG, tanto en condrocitos como en explantes de cartílago, describen el efecto del fármaco sobre la atenuación de la inflamación mediada por citoquinas y sobre la degradación del cartílago (Chan PS 2006; Imagawa K 2011). El SG inhibe la citoquina IL-1 β , con ello modula la señal pro-inflamatoria y activa el programa anabólico en los condrocitos, incrementando la síntesis de proteoglicano y de la proteína central de los agreganos (Bassleer C 1998; Verbruggen G 2006). Además, frena la degradación del cartílago mediante la disminución constante de la expresión de la MMP-13 (Dodge GR 2003). A pesar de su actividad condroprotectora y de los efectos anti-inflamatorios que se le atribuyen al SG en condrocitos y en otros tipos de células articulares (Largo R 2003; Gouze JN 2006; Jang BC 2007), hoy en día no se ha demostrado completamente su mecanismo de acción. Sabemos que el SG inhibe parcialmente la activación del NF- κ B *in vitro*, hecho que podría disminuir la expresión de COX-2 y por lo tanto la síntesis de PGE₂ (Largo R 2003), siendo esta vía una explicación para los efectos que el SG manifiesta en los estudios *in vivo* (Herrero-Beaumont G 2007). Además, en modelos experimentales de artrosis inducida, también se ha demostrado el efecto anti-inflamatorios descrito *in vitro* (Zou L 2009) y se ha observado una menor degradación del cartílago y un incremento en la síntesis de proteoglicanos (Oegema TR Jr 2002; Jawed H 2011).

Las investigaciones recientes revelan, que el SG podría jugar un papel importante en la atenuación del daño estructural e inflamatorio en el cartílago artrósico de algunos pacientes, con un fenotipo clínico de leve a moderado. Además, su capacidad de incrementar el flujo de la ruta HBP y modular O-GlcNAcilación de proteínas, lo definen como un componente importante de la maquinaria de protección celular. En esta tesis hemos estudiado el sistema de O-GlcNAc en la articulación artrósica y su modulación a través del SG.

II. OBJETIVOS

La *O-linked* β -N-Acetil-glucosaminación proteica (O-GlcNAción), es una modificación post-traducciona que modula numerosos mecanismos intracelulares, como la transcripción génica, la vida media de las proteínas, la actividad enzimática, etc. Se ha postulado, que en respuesta a alteraciones agudas, esta modificación se asocia a la respuesta de la célula ante un déficit de nutrientes o al estrés. Sin embargo, la alteración de este sistema de forma crónica en el tejido, se ha asociado con la patogenia de diferentes enfermedades degenerativas y asociadas al envejecimiento, como la diabetes, el Parkinson o el Alzheimer. Por el momento se desconoce si también durante la artrosis, la enfermedad articular degenerativa con mayor grado de invalidez, existen alteraciones en la O-GlcNAcilaón de las proteínas celulares.

Por tanto, los objetivos de esta tesis fueron:

- I. Analizar la cantidad de proteínas O-GlcNAcilaas en el cartílago articular de pacientes con artrosis de rodilla avanzada, en comparación con las que se encuentran en el cartílago articular de donantes sanos. Además, estudiaremos la alteración en las enzimas responsables de esta modificación: OGT y OGA, en el cartílago de los pacientes y lo compararemos con el de los donantes sanos. Simultáneamente, estudiaremos si en este cartílago artrósico se expresan marcadores de hipertrofia celular, ya que este fenotipo celular se ha relacionado con la O-GlcNAcilaón proteica.
- II. Estudiar si la O-GlcNAcilaón de proteínas en los condrocitos puede ser modificada por la presencia de la citoquina catabólica IL-1, que se ha descrito como un mediador fundamental en la destrucción articular durante la artrosis.
- III. Estudiar si, en un modelo de artrosis en conejos inducida por inestabilidad articular, la alteración en las proteínas O-GlcNAcilaas y en las enzimas que regulan este proceso, son similares a las encontradas en el cartílagos artrósico humano. Estudiaremos el sistema a diferentes tiempos de evolución de la artrosis, y analizaremos además si este modelo de artrosis reproduce también las características de la artrosis humana, en cuanto a síntesis de mediadores catabólicos y pro-inflamatorios.
- IV. Analizaremos el efecto de la administración de sulfato de glucosamina (SG), un inductor de la ruta de las hexosaminas, sobre diferentes parámetros histológicos y moleculares en el cartílago artrósico. Además, estudiaremos si la administración de SG modifica la presencia de proteínas O-GlcNAcilaas en el cartílago de los conejos con artrosis, así como la presencia de las enzimas que regulan este sistema.
- V. Por último, estudiaremos el efecto de la administración de SG, sobre la O-GlcNAcilaón de la subunidad p65 del NF- κ B, en el modelo experimental de artrosis en conejo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTUDIOS EN PACIENTES.

Para esta tesis se incluyeron 12 pacientes que presentaban evidencias clínicas y radiológicas de artrosis de rodilla, de acuerdo con los criterios de la Sociedad Americana de Reumatología (ACR). Todos ellos se sometieron a una artroplastia total de rodilla en el servicio de cirugía ortopédica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid (Madrid, España). El grupo control que incluye 10 donantes anónimos, sin evidencias conocidas de enfermedades articulares, se ha obtenido a través de la Fundación Servicio de Trasplantes del Hospital Clínico de Barcelona (Barcelona, España). Los comités éticos locales aprobaron el estudio y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes.

Durante la cirugía se recogieron muestras de cartílago articular del cóndilo femoral y del plato tibial. Dado el carácter parcheado del daño articular en la artrosis, se han utilizado al menos tres porciones diferentes de cartílago articular para evitar la obtención de resultados sesgados. Parte de las muestras de los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido para llevar a cabo estudios bioquímicos de síntesis y expresión de proteínas. Otra parte de las muestras recogidas fueron digeridas con tripsina (Tripsyn-Versene (EDTA) 200 mg/L: Lonza, Walkersville, MD, U.S.A.) durante 15 minutos y con colagenasa tipo IV (Collagenase type IV 1 g/L: Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 5 horas para aislar los condrocitos del tejido. Parte de los condrocitos aislados se sembraron en placas y se dejaron crecer para su posterior utilización en experimentos *in vitro* y otra parte fueron congelados en nitrógeno líquido para su posterior utilización en estudios bioquímicos de síntesis y expresión proteica. Todas las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización. Los estudios de inmunohistoquímica se realizaron con una parte de las muestras que fueron fijadas durante 24 horas en un tampón frío de paraformaldehído al 4% y se procesaron para ser incluidas en parafina.

2. ESTUDIOS EN ANIMALES.

Para esta tesis utilizamos 61 conejos albinos de raza Nueva Zelanda (NZ) machos esqueléticamente maduros (≈ 3.5 Kg de peso; 5 meses de edad) suministrados por la Granja San Bernardo (Navarra, España). Los animales se aclimataron durante dos semanas en jaulas individuales de 50 x 40 x 40 cm. Las condiciones ambientales de luz (Ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y temperatura se mantuvieron constantes durante todo el estudio. Durante la aclimatación se permitió acceso *ad libitum* al agua y comida (Dieta comercial

estándar para conejos de Panlab). Al inicio del estudio, la comida de todos los conejos se limitó a 160 gramos al día.

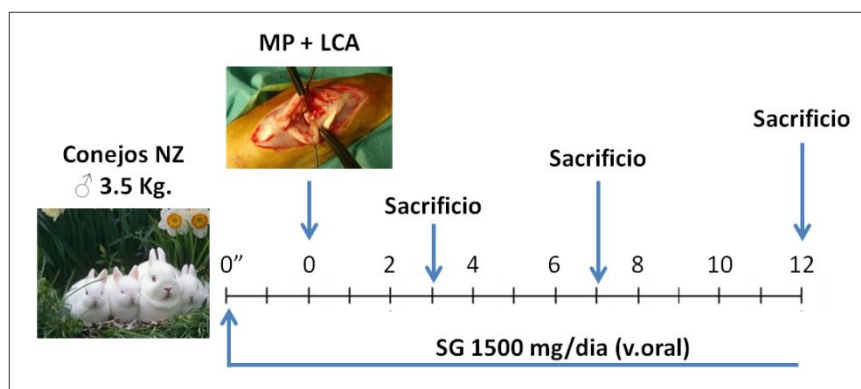


Figura 1. Esquema del modelo experimental de OA inducida quirúrgicamente en conejos. Representación de las semanas de evolución desde el momento de la cirugía (0) hasta el sacrificio (12). (0'') Inicio de la administración preventiva de SG, vía oral. MP+LCA = Menisectomía Parcial y Sección del Ligamento Cruzado Anterior. NZ = Conejos Raza Nueva Zelanda. SG = Sulfato de Glucosamina.

El estudio se inició con 21 conejos. A 15 de ellos se les indujo una artrosis experimental de forma quirúrgica, mediante menisectomía parcial de la mitad anterior del menisco medial (MP) y sección del ligamento cruzado anterior (LCA) en ambas rodillas. La cirugía tuvo lugar bajo anestesia general mediante inyección intramuscular de una combinación de 2 mg/Kg de xylacina (Rompun, Bayer) e hidrocloreuro de ketamina (Ketolar, Parque-Davis) en proporción 3:1 (Benito MJ 2000) y en condiciones de asepsia. Se realizó profilaxis antibiótica con cefonicid i.m. (100 mg/Kg) (Smith and Beecham) antes de la cirugía y los tres días siguientes. Bajo estas condiciones de esterilidad se abordó la rodilla mediante una incisión pararrotuliana interna. Tras seccionar la membrana sinovial longitudinalmente y exponer así la cavidad tibio-femoral, procedemos a la sección del LCA en su inserción femoral con un bisturí. A continuación, con ayuda de unas pinzas, sujetamos la mitad anterior del menisco medial y seccionamos el ligamento menisco-tibial. Liberamos el fragmento de menisco practicando una incisión entre la mitad anterior y posterior del menisco medial y en la inserción periférica. Una vez liberado el fragmento, se resecó la zona y se cerró la articulación por planos. Se aplicó un apósito adhesivo para impermeabilizar la incisión y acelerar la cicatrización. Tras la cirugía se permitió que los animales se movieran libremente dentro de las jaulas y se dejó evolucionar la artrosis inducida en las articulaciones durante 3, 7 y 12 semanas ($n = 5$ en cada caso). Los 6 conejos restantes sanos no fueron sometidos a cirugía y se dejaron evolucionar en paralelo a los otros grupos. Se sacrificaron de dos en dos a las 3, 7 y 12 semanas del estudio y puesto que no

observamos diferencias significativas estructurales ni moleculares, se incluyeron todos en un mismo grupo llamado grupo *control*.

Los 40 conejos restantes se dividieron en cuatro grupos. El grupo *OA 12w*, formado por 16 conejos con artrosis experimental inducida de forma quirúrgica (MP-LCA), se dejó evolucionar durante 12 semanas.

El grupo *OA 12w+Gs*, formado por 14 conejos con artrosis inducida de forma quirúrgica (MP-LCA) y que además se les administró de forma preventiva sulfato de glucosamina (SG; Xicil, Rottapharm) a razón de 1500 mg por conejo y por día, dos semanas antes de la intervención quirúrgica y hasta el final del ensayo. El fármaco se administró de forma oral con la comida. Para asegurarnos el consumo diario de la totalidad del fármaco, restringimos la dieta de los conejos como se indica anteriormente a 160 gramos por día. Para evitar diferencias en el peso de los conejos, la restricción de la comida se extiende al resto de los grupos.

El tercer grupo incluye 5 conejos sanos que no fueron sometidos a cirugía ni consumieron SG. Se dejaron evolucionar en paralelo a los otros grupos y se sacrificaron al terminar el estudio.

Añadimos un cuarto grupo, el grupo *Sham* formado por 5 conejos a los que se les practicó la incisión pararrotoiana interna y se les seccionó la membrana sinovial, con objeto de simular las condiciones inflamatorias de la cirugía y comprobar que dicha inflamación no afecta al resultado del estudio. Los conejos del grupo sham se dejaron evolucionar en paralelo al grupo *OA 12w* y fueron sacrificados al terminar el estudio.

El análisis de los parámetros estructurales y pro-inflamatorios reveló que no existían diferencias significativas entre el grupo de conejos sanos y el grupo de conejos *sham*. Este resultado nos permitió fusionar los datos de ambos grupos y estudiarlos como un solo grupo al que llamamos grupo *control*.

Finalizado el ensayo, los animales fueron sacrificados mediante la administración intracardiaca de pentobarbital sódico (50 mg/Kg) (Pentotal, Abbott) previa anestesia general descrita anteriormente. Tras el sacrificio se recogió hueso subcondral y cartílago articular del cóndilo interno del plato tibial de ambas rodillas. Una parte del cartílago fue digerida con tripsina y colagenasa tipo IV para aislar los condrocitos del tejido (Procedimiento descrito en el apartado 1). Otra parte del cartílago y el hueso subcondral se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Tanto los condrocitos aislados como el cartílago total y el hueso subcondral se procesaron para llevar a cabo estudios bioquímicos de síntesis y expresión de proteínas. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización. Los cóndilos femorales de ambas rodillas fueron seccionados y fijados durante 24 horas en un tampón frío de paraformaldehído

al 4% y se procesaron para ser incluidos en parafina. Los cóndilos femorales se utilizaron para estudios de histopatología del cartílago articular.

Todos los ensayos fueron aprobados por el comité ético local y en todos los procedimientos se respetó la directiva vigente de la UE para la manipulación de animales de experimentación.

3. CULTIVOS CELULARES: CONDROCITOS ARTRÓSCICOS HUMANOS (COH).

Los condrocitos se obtuvieron del cartílago articular de pacientes con artrosis que presentaban evidencias clínicas y radiológicas de artrosis de rodilla de acuerdo con los criterios de la ACR. A dichos pacientes se les practicó una artroplastia total de rodilla por cirugía convencional en el servicio de cirugía ortopédica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid (Madrid, España).

El cartílago articular procedente del cóndilo femoral y del plato tibial se diseccionó en un medio estéril. El cartílago fue digerido secuencialmente con tripsina (Tripsyn-Versene (EDTA) 200 mg/L: Lonza, Walkersville, MD, U.S.A.) durante 15 minutos y con colagenasa tipo IV (Collagenase type IV 1 g/L: Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 5 horas. La reacción se paró añadiendo medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium, Lonza, Walkersville, MD, U.S.A.) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (STF) (Lonza), 60 U/ml de penicilina, 60 µg/ml de estreptomina y 2 mmol/L de glutamina (Lonza). Las células se resuspendieron en medio DMEM con 10% de STF, se sembraron en placas de 100x20 mm y se incubaron a 37°C en una estufa humidificadora con un 5% de CO₂. Los experimentos se realizaron después de que las células llegaran a un 100% de confluencia tras el primer pase. Las células utilizadas en los experimentos constituían una población homogénea de células adheridas y con un fenotipo característico de condrocitos. Para la caracterización celular se realizó una tinción con Safranina O, para la determinación de glicosaminoglicanos sulfatados y azul alcian-PAS para los glicosaminoglicanos totales. Mediante inmunohistoquímica se confirmó la presencia de colágeno tipo II y agreicanos en los cultivos de condrocitos (Reginato AM 1994).

Las células fueron deplecionadas de STF 48 horas antes de la realización de los experimentos. Tras la depleción fueron estimuladas con diferentes concentraciones de la citoquina IL-1 α (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) y a distintos tiempos (10 ng/mL y 100 ng/mL; 3 horas, 6 horas y 24 horas). La curva de dosis-tiempo reveló que la concentración apropiada para el estudio era 10 ng/mL (datos no mostrados). Al finalizar el experimento, las células se lavan con salino frío y se levantan de la placa con ayuda de un *scraper*. Los condrocitos se recogen con

pipeta y se separan del salino por centrifugación. El pellet de células se congela a -80°C hasta su utilización.

Los comités éticos locales aprobaron el estudio y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes.

4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.

Las muestras de cartílago articular congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C , se pulverizaron mediante homogenización mecánica en una cámara enfriada previamente con nitrógeno líquido. El homogeneizado resultante se resuspendió en un tampón de lisis frío (15 mM HEPES pH 7.3, 10 % Glicerol, 0.5 % Nonidet P-40, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA) y se utilizaron inhibidores de proteasas específicos [Phenil-metil-sulfonil-fluoride (PMSF) 0.1M, Coctel de inhibidores de proteasas 10 uL/mL (CIP; Sigma, St. Louis, MO, USA) y Thiamet-G 1uL/mL (Donado amablemente por Natasha E Zachara, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA)].

Las proteínas totales de los condrocitos aislados del cartílago y de los COH, se extraen aplicando directamente sobre el pellet de células el tampón de lisis frío mencionado con los inhibidores específicos.

En ambos casos, se deja actuar el tampón en hielo durante 15 minutos y se centrifugan las muestras a 12.000 r.p.m, 15 minutos a 4°C . La concentración de proteínas totales se midió por el método del ácido bicinonínico (BCA) como se explica en el apartado 9 de los materiales y métodos.

5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES Y CITOPLÁSMICAS.

Obtuvimos la fracción nuclear y citoplásmica de los condrocitos aislados del cartílago articular, utilizando un protocolo basado en el empleo de soluciones con diferentes concentraciones de sales, que permiten la lisis progresiva de las células. En primer lugar incubamos el pellet de condrocitos sin descongelar con la solución baja en sales [Low Salt Buffer (LSB); 100 mM Hepes pH7.3, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA] durante 10 minutos en hielo. Con esta solución conseguimos que las células se hinchen por tensión osmótica y se rompa la membrana

plasmática liberando el contenido citoplásmico. Centrifugamos un minuto a 16.000 r.p.m y separamos el sobrenadante que contiene la fracción citosólica, del pellet que contiene la fracción nuclear. Tras centrifugar la fracción citosólica a 14.000 r.p.m durante 20 minutos a 4°C, recogemos el sobrenadante y medimos la concentración proteica utilizando el método del BCA.

A continuación, lavamos la fracción nuclear con LSB para eliminar cualquier resto de fracción citosólica y de membrana plasmática. El pellet resultante, se incuba al menos 30 minutos a 4°C en rotación con la solución alta en sales [High Salt Buffer (HSB); 100 mM Hepes pH7.3, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 5 M NaCl, 20 %Glicerol]. Para romper exitosamente la membrana nuclear y liberar completamente la fracción nuclear, además de la HSB es necesario someter las muestras a ultrasonidos, utilizando un sonicador estándar. Tras centrifugar a 14.000 r.p.m durante 20 minutos a 4°C, recogemos el sobrenadante y medimos la concentración proteica utilizando el método del BCA.

6. WESTERN BLOT.

En todos los ensayos de western blot se han utilizado entre 20 y 25 ug de proteína total. En todos los casos, las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 8% o al 10% (En cada caso en función del peso molecular estimado de la proteína de estudio) mediante electroforesis y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Después de la transferencia, las membranas se bloquearon en todos los casos durante 60 minutos a temperatura ambiente (R.T) con un tampón 0.1 mmol/L Tris pH 7.4, 0.5 mmol/L NaCl, 0.5% Tween-20 y 3% leche desnatada. A continuación, las membranas se incubaron toda la noche (O.N) a 4°C en un tampón 0.1 mmol/L Tris pH 7.4, 0.5 mmol/L NaCl, 0.5% Tween-20 y 3% albúmina de suero bovino (BSA) con los anticuerpos anti residuos de O-Linked N-Acetylglucosamina [CTD110.6 (Abcam) y RL2 (Thermo fisher scientific)], anti OGT [SQ17 y DM17 (Sigma), AL27, AL28, AL34 y AL35 (Donados por la Dra. Natasha E Zachara, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA), ab97274, ab96718 y ab59135 (Abcam)], anti OGA 345 (Donado por el Dr. Gerald W. Hart, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA), anti COX-2 (Santa Cruz Biotechnology) y anti NF-κB p65 (C-20, Santa Cruz Biotechnology).

La detección de las proteínas se llevó a cabo mediante la incubación de las membranas con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. Se utilizó un kit de quimioluminiscencia (Immobilontm western, Millipore, Billerica, MA, USA) para detectar la señal.

La gran variedad de anticuerpos anti OGT que se utilizaron, nos permitió detectar varias isoformas de la enzima. Para determinar la especificidad de las isoformas empleamos un protocolo de competición. Utilizamos tres péptidos antigénicos sq17, dm17 y Al28 (Donados por la Dra. Natasha E Zachara, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA) que reconocen una secuencia específica de los anticuerpos anti OGT SQ17, DM17 y Al 28 respectivamente. Incubamos los anticuerpos con sus respectivos péptidos antigénicos durante al menos 60 minutos a R.T. De esta manera, el péptido antigénico se une al anticuerpo bloqueando el lugar de unión específico a OGT. Posteriormente, incubamos las membranas de nitrocelulosa previamente transferidas, con el anticuerpo unido al péptido antigénico. Tras el revelado observamos las isoformas inespecíficas que no se compiten con el anticuerpo unido al antígeno, mientras que las isoformas específicas que sí se compiten, desaparecen. Este test de competencia, nos permite afirmar que las isoformas de OGT que detectamos son específicamente OGT.

Las bandas se han evaluado por densitometría (Bio-rad, GS-800 Calibrated Densitometer) y los resultados han sido expresados en unidades arbitrarias de densitometría (U.A.D) utilizando el software Quantity One (Versión 4.6.3.).

7. INMUNOPRECIPITACIÓN.

El aislamiento de proteínas mediante inmunoprecipitación (IP) se ha llevado a cabo utilizando el kit comercial de Life Technologies, consistente en unas bolas magnéticas unidas a proteína G (Dynabeads[®] Protein G for Immunoprecipitation) y un concentrador de partículas magnético (DynaMag[™]). El aislamiento de la proteína de interés se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante que se resumen a continuación. En primer lugar las Dynabeads[®] Protein G se incuban con 8 µg del anticuerpo anti NF-κB p65 (C-20, Santa Cruz Biotechnology) durante 45 minutos en rotación a temperatura ambiente. Posteriormente, las Dynabeads[®] Protein G unidas al anticuerpo se incuban O.N, a 4°C en rotación con 40 µg de las proteínas nucleares y citoplásmicas extraídas de los condrocitos aislados del cartílago articular de los conejos. Tras la incubación, lavamos con un tampón fosfato a pH 7.4 (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaHPO₄, 2mM KH₂PO₄) con ayuda del DynaMag[™] que retiene las Dynabeads[®] Protein G unidas

al anticuerpo y al antígeno deseado. De esta manera, conseguimos capturar la proteína deseada y eliminar limpiamente el resto de las proteínas de la muestra. La elución de la proteína se consigue hirviendo la muestra a 70°C durante 10 minutos y separando las Dynabeads® Protein G con el DynaMag™.

La proteína aislada se carga en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% y se procede siguiendo el protocolo de western blot descrito en el apartado 6 de materiales y métodos.

Las membranas transferidas, se incubaron con los anticuerpos anti NF-κB p65 (C-20, Santa Cruz Biotechnology) y anti residuos de O-Linked N-Acetylglucosamina (RL2 (Thermo fisher scientific)).

8. EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY).

El ensayo de EMSA es una técnica de afinidad electroforética que estudia la interacción proteína-DNA o proteína-RNA. Utilizamos un oligonucleótido de secuencia conocida para NF-κB marcado radiactivamente con γ -³²P. A continuación, empleamos un kit comercial (Promega) y seguimos las indicaciones del fabricante para proceder a la reacción de reconocimiento y unión entre el oligonucleótido NFκB- γ -³²P y la muestra de proteínas totales extraídas de los condrocitos aislados de los conejos. Las proteínas unidas a NFκB- γ -³²P se separan electroforéticamente en un gel de poliacrilamida. En el mismo gel, como control negativo, cargamos el oligonucleótido frío, es decir sin marcaje radioactivo y una muestra de proteínas libres, es decir, no unidas al NFκB- γ -³²P.

La señal radioactiva del gel se imprimió en una película de baja sensibilidad y se evaluó por densitometría (Bio-rad, GS-800 Calibrated Densitometer). Los resultados han sido expresados en unidades arbitrarias utilizando el software Quantity One (Version 4.6.3.).

9. ANÁLISIS DEL CONTROL CARGA (BCA y EZBLUE).

Las muestras de tejido de los estudios humanos y de animales, no nos permiten utilizar los controles de carga empleados tradicionalmente en los ensayos de western blot. Tanto los controles estructurales (Tubulina, β-actina, etc.) como los metabólicos (GAPDH, etc.) no son fiables en nuestros estudios porque las células procedentes de tejido artrósico se comportan

estructural y metabólicamente de manera diferente a las células procedentes de tejido sano. Como control de carga, hemos utilizado dos técnicas diferentes para asegurarnos las mismas condiciones en cuanto a concentración de proteínas se refiere.

En primer lugar, las muestras de proteínas extraídas según los protocolos descritos en los apartados 4 y 5 de materiales y métodos, han sido cuantificadas por el método del ácido bicinonínico (BCA). El ácido bicinonínico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret, figura 2).

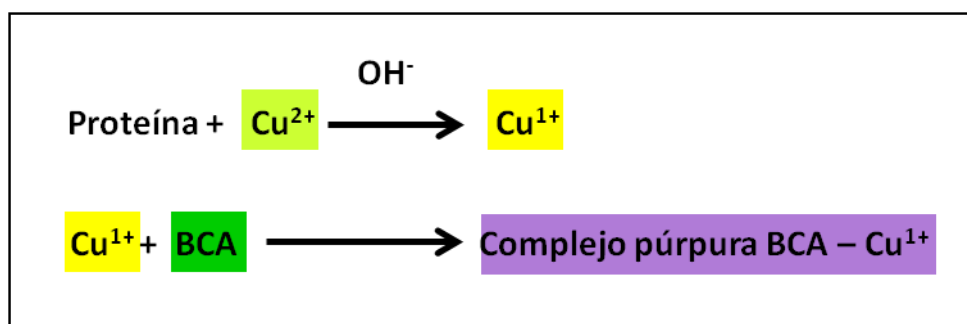


Figura 2. Reacción de Biuret.

En segundo lugar, la cantidad de proteína cargada en los geles de poliacrilamida-SDS se ha estimado utilizando el reactivo EZBlue™Gel Staining Reagent (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para este ensayo se han utilizado 10 ug de proteínas. Tras la separación electroforética de las proteínas en el gel de poliacrilamida-SDS al 10 %, se fijan las proteínas al gel utilizando una solución 50% metanol-10% ácido acético durante 15 minutos. A continuación se lava el gel con agua desionizada y se deja incubando O.N con el reactivo EZBlue™. Tras la incubación, es aconsejable lavar con agua desionizada entre 3 horas y O.N, para eliminar la tinción del fondo del gel. A continuación se densitometran los carriles (Bio-rad, GS-800 Calibrated Densitometer) y se analizaron estadísticamente.

10. INMUNOHISTOQUÍMICA.

La localización de OGT en el cartílago articular de pacientes artrósicos y donantes sanos, se ha llevado a cabo utilizando secciones de parafina de 4 μm . Las secciones fueron desparafinadas y

rehidratadas con concentraciones decrecientes de etanol. La peroxidasa interna se inhibió con una solución de metanol-H₂O₂ (3%) y posteriormente se incubaron los cortes con tripsina [0.1 % peso/vol. En CaCl₂ (0.1 %) pH 7] 15 minutos a 37°C para exponer el antígeno. Una vez procesados los cortes, están preparados para la incubación O.N a 4°C con el anticuerpo anti OGT DM17 (Sigma, St. Louis, MO, USA) en cámara húmeda. El anti OGT se detectó utilizando un anticuerpo secundario biotinilado (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) cuya señal se amplificó con el reactivo ABCComplej/peroxidasa (Biotina-Avidina-Peroxidasa; Thermo Fisher). La visualización de la señal se consiguió con el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetra-hidroclorado (DAB; Dako, Camarillo, CA). Finalmente, los cortes fueron contrastados con hematoxilina y montados en DPX (VWR International Ltd, Poole, England).

En paralelo se realizaron controles negativos, eliminando el anticuerpo anti OGT de la solución de incubación.

Además, se llevaron a cabo otros controles negativos, en los que el anticuerpo anti OGT se incubó previamente con el péptido antigénico dm17 (Donado amablemente por Natasha E Zachara, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA), bloqueando la región específica de unión del anticuerpo a la proteína. De esta manera comprobamos que la señal observada en los cortes es específicamente OGT, porque se compite y desaparece cuando incubamos el anticuerpo con el péptido específico.

11. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS DEL CARTÍLAGO.

La histopatología microscópica se evaluó en el cartílago de los pacientes y donantes sanos y en los fémures extraídos durante el sacrificio del modelo experimental en conejos. En ambos casos las muestras fueron fijadas durante 24 horas en paraformaldehído (4%). Los fémures del modelo de conejos necesitaron ser decalcificados en una solución 98% fórmico- 37% formaldehído durante 3 semanas y posteriormente fueron tallados. En el caso de las muestras humanas el contenido en hueso era mucho menor y necesitaron tan solo una semana para el proceso de decalcificación. En todos los casos las muestras fueron incluidas en parafina. Se realizaron secciones de parafina de 4 µm que fueron desparafinadas e hidratadas para realizar las tinciones de azul alcian y hematoxilina-eosina. Las preparaciones se evaluaron de forma ciega por dos observadores independientes y de acuerdo a la escala publicada por *Mankin* (Mankin HJ 1971) (Tabla 1).

| SUBESCALAS | ALTERACIONES | PUNTUACIÓN |
|--|---|---------------------------------|
| ESTRUCTURA | <ul style="list-style-type: none"> • Normal. • Irregularidades en la superficie. • Irregularidades en la superficie y pannus. • Hendiduras hasta la zona de transición. • Hendiduras hasta la zona radial. • Hendiduras hasta la zona calcificada. • Desorganización completa. | 0 1 2 3 4 5 6 |
| CELULARIDAD | <ul style="list-style-type: none"> • Normal. • Hiper celularidad difusa. • Clones. • Hipocelularidad. | 0 1 2 3 |
| TINCIÓN DE LA MATRIZ | <ul style="list-style-type: none"> • Normal. • Reducción leve. • Reducción moderada. • Reducción severa. • Sin tinción. | 0 1 2 3 4 |
| INTEGRIDAD DE LA LIMITANTE BASÓFILA | <ul style="list-style-type: none"> • Intacta. • Cruzada por vasos. | 0 1 |

Tabla 1. Escala de Mankin para la valoración histopatológica del cartílago articular (Mankin HJ 1971).

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados obtenidos al densitometrar la señal quimioluminiscente de las membranas de western blot [Unidades arbitrarias de densitometrado (UAD)], se expresan como n veces sobre el control.

Todos los análisis estadísticos se desarrollaron utilizando el programa SPSS 11.0 para Windows (SPSS Inc.). Los datos entre los diferentes grupos se compararon utilizando los análisis no paramétricos Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue inferior a 0.05. Los datos han sido expresados como la media \pm Error Estimado de la Media (EEM).

IV. RESULTADOS

I. ESTUDIO DEL SISTEMA DE O- β -N-ACETILGLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS Y DE LOS MARCADORES DE HIPERTROFIA CONDROCITARIA, EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR DE PACIENTES CON ARTROSIS AVANZADA, EN COMPARACIÓN CON DONANTES SANOS.

El primer objetivo en la tesis, consistió en analizar la O-GlcNAcilación de proteínas y los marcadores de hipertrofia condrocitaria en la OA, enfermedad crónica, degenerativa y asociada a la edad en la que nunca antes se había estudiado esta modificación. Abordamos el estudio del patrón de proteínas O-GlcNAcizadas y de las enzimas implicadas en esta modificación en el cartílago articular de pacientes con artrosis y donantes sanos.

I.1 Información de los pacientes.

Para esta tesis reclutamos 12 pacientes que presentaban evidencias clínicas y radiológicas de artrosis de rodilla. En todos los casos los pacientes presentaban un estado muy avanzado de la enfermedad, motivo por el cual se sometieron a una artroplastia total de rodilla en el servicio de cirugía ortopédica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid (Madrid, España). El grupo control incluía 10 donantes, sin evidencias conocidas de enfermedades articulares, facilitados por la Fundación Servicio de Trasplantes del Hospital Clínico de Barcelona (Barcelona, España).

Se escogieron únicamente individuos mayores de 65 años. El grupo de los pacientes artrósicos estaba formado en un 50% por hombres y en un 50% por mujeres. En el caso de los donantes el 60% eran hombres y el 40% mujeres (Tabla 1). Seleccionamos individuos de edades similares y nos aseguramos de que no predominara un sexo sobre otro, para evitar factores de confusión en el estudio.

Para el estudio histopatológico del cartílago articular se evaluaron según la escala de Mankin, muestras del tejido en secciones teñidas con hematoxilina-eosina y con azul alcian. La tabla 1 muestra el resultado del Mankin. Observamos una puntuación más elevada en los pacientes artrósicos que en los donantes sanos. En los pacientes observamos alteraciones estructurales como hendiduras en el cartílago y erosiones focales que alcanzaban la capa radial y en ocasiones dejaban expuesto el hueso subcondral. En otros casos observamos irregularidades en la superficie con presencia de pannus. Advertimos en general una densidad celular baja y la presencia frecuente de clones celulares tanto en las capas superficiales como en las más profundas. Sin embargo en algunas zonas, observamos una hiper celularidad difusa. En los

pacientes artrósicos la pérdida de proteoglicanos de la matriz se manifestó con una disminución de la tinción entre leve y moderada en algunos casos y de moderada a severa en otros. En cuanto a la limitante basófila observamos en algunos casos irregularidades por el cruce de vasos sanguíneos procedentes del hueso subcondral.

| Información basal | control (n = 10) | OA (n = 12) |
|-------------------|------------------|-------------|
| Hombres | 60% | 50% |
| Mujeres | 40% | 50% |
| Edad | 65±3 | 71±3 |
| Mankin | 1 - 4 | 11 - 14 |

Tabla 1. Información basal de los pacientes. Datos demográficos y Mankin de los pacientes OA y los donantes sanos.

I.2 Cuantificación de las proteínas O-GlcNAcizadas en el cartílago articular de pacientes artrósicos y de donantes sanos.

La O-GlcNAcización de proteínas nunca antes había sido estudiada en el cartílago articular. Por este motivo nuestro primer abordaje experimental consistió en analizar los diferentes anticuerpos disponibles, capaces de detectar mediante la técnica de western blot proteínas O-GlcNAcizadas. Los anticuerpos más utilizados en la literatura son dos: El anticuerpo CTD 110.6 y el anticuerpo RL2.

Los resultados obtenidos con el anticuerpo CTD 110.6 revelaban un patrón de bandas claramente diferencial. Observamos proteínas O-GlcNAcizadas con distinto peso molecular, que se distribuían a lo largo del gel, de manera diferente en pacientes artrósicos frente a donantes sanos (Figura 1.A). En el grupo control, las proteínas O-GlcNAcizadas se definían en bandas por encima de los 90 KDa y por debajo de los 60 KDa. En los pacientes artrósicos, las proteínas se acumulaban en torno a los 80 KDa. A pesar de las diferencias observadas entre ambos grupos, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la cuantificación de la O-GlcNAcización (Figura 1.D).

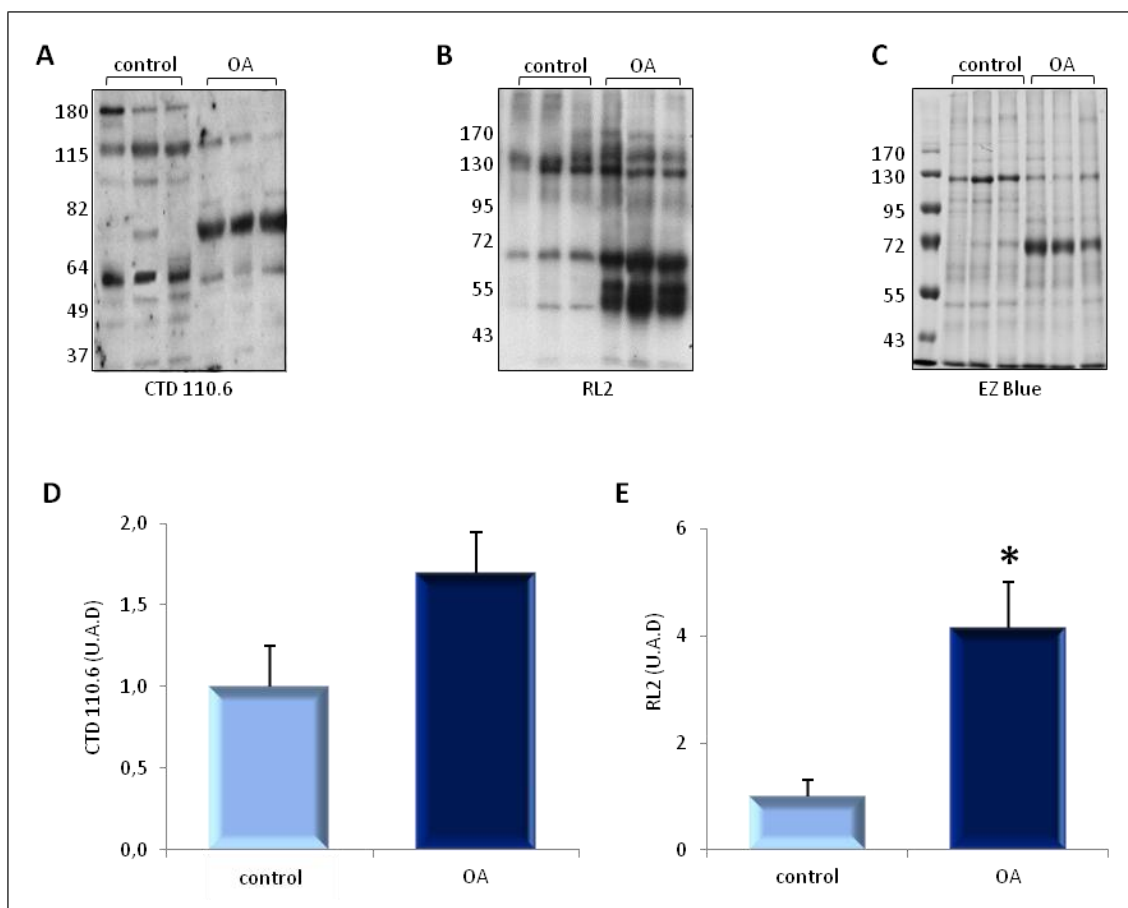


Figura 1. Patrón de proteínas O-GlcNAcadas en el cartilago articular de los pacientes. (A) y (B) Western blot representativo de las proteínas detectadas con los anticuerpo CTD 110.6 y RL2, respectivamente. (D) y (E) Análisis densitométrico del área total de proteínas O-GlcNAcadas detectadas con los anticuerpos CTD 110.6 y RL2, respectivamente. (C) Tinción con EZ Blue utilizada como control de carga. Datos expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs. grupo control.

Los ensayos realizados con el anticuerpo RL2, también describían un patrón diferencial de proteínas O- GlcNAcadas entre los pacientes artrósicos y el grupo control. La mayor acumulación de proteínas O-GlcNAcadas en el grupo OA, se detectó en el rango entre 120 y 200 kDa y entre 45 y 70 kDa. Las proteínas que menos se O- GlcNAcaban se observaron por encima de los 170 kDa y por debajo de los 40 kDa (Figura 1.B). Cuantificamos la cantidad total de estas proteínas en cada carril y detectamos una acumulación significativamente mayor en los pacientes con artrosis (Figura 1.E).

La mayoría de los pacientes y donantes analizados reflejaban un patrón de proteínas O-GlcNAcadas similar al que observamos en las figuras 1.A y 1.B. Sin embargo con ambos anticuerpos observamos algunos casos en los que el patrón era ligeramente distinto. Dos de los pacientes con artrosis no mostraban un acúmulo de proteínas y uno de los donantes sin embargo, presentaban un nivel de O-GlcNAc más parecido al perfil artrósico.

En la figura 1.C representamos los resultados de la tinción con el reactivo EZBlue™ que utilizamos como control de carga. Tradicionalmente utilizábamos la tubulina como control de carga estructural, sin embargo los resultados obtenidos con la tubulina en el tejido reflejaban diferencias entre los grupos OA y control. Observamos un incremento en la síntesis de tubulina por parte del grupo OA. Probablemente, dichas diferencias se debían a las alteraciones histopatológicas descritas en el cartílago de los pacientes. Utilizamos la tinción con EZBlue™ y observamos que las proteínas se distribuían de manera diferencial entre ambos grupos (figura 1.C). Sin embargo, la cuantificación total de cada carril reveló que no existían diferencias significativas entre los pacientes y los donantes, por lo que dimos por válidos los resultados obtenidos para la cuantificación de la cantidad de proteínas O-GlcNAcizadas.

I.3 Estudio de las enzimas OGT y OGA en el cartílago articular y en los condrocitos aislados de los pacientes con artrosis.

En este apartado estudiaremos la presencia en el cartílago de las enzimas implicadas en la regulación del sistema de O-GlcNAcización de proteínas.

I.3.1 Determinación de las diferentes isoformas de la enzima OGT.

Existe una amplia variedad de anticuerpos utilizados en la bibliografía para detectar la acumulación de OGT mediante western blot. Por este motivo, en primer lugar probamos diferentes anticuerpos y determinamos el más adecuado para emplearlo en nuestras muestras (Figura 2).

Los anticuerpos utilizados, tanto los comerciales como los elaborados y donados por el laboratorio de la Dra. Natasha Zachara (Universidad Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA) detectaron varias isoformas de la enzima OGT en el cartílago articular. Tres de las isoformas detectadas se describen en la literatura y se conocen como: OGT_{nc} (OGT nucleocitoplásmica, 130 KDa), OGT_m (OGT mitocondrial, 100 KDa) y OGT_s (OGT *short* o corta, 80 KDa) (Hanover JA 2003; Vocadlo DJ 2012; Lunde IG 2012). Observamos también la presencia de dos bandas de peso molecular estimado en 65 KDa y 50 KDa, que no están descritas en la literatura como isoformas de OGT.

Los ensayos de western blot realizados con muestras humanas, se llevaron a cabo utilizando el anticuerpo DM17, que reconocía las isoformas de OGT descritas en la literatura, tanto en condrocitos aislados como en el cartílago total.

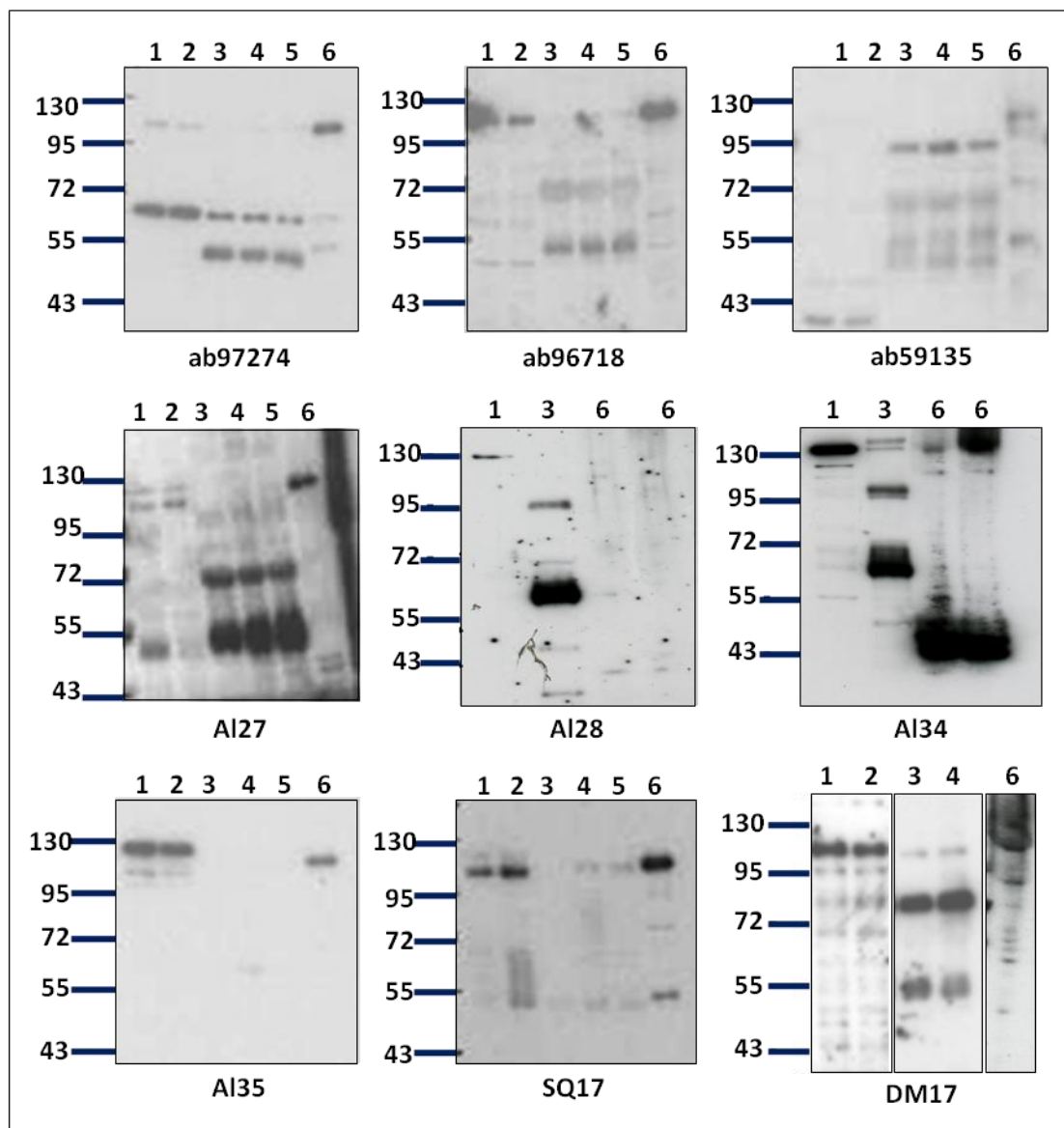


Figura 2. Western blot representativos de los diferentes anticuerpos anti-OGT testados en el cartílago articular y en los condrocitos aislados de los pacientes. 1 y 2: Condrocitos aislados de pacientes OA; 3, 4 y 5: Cartílago articular de pacientes OA, 6: Cerebro de ratón (Control positivo).

Determinamos la especificidad de las isoformas con la ayuda de péptidos antigénicos de los anticuerpos, que se unen a ellos bloqueando la interacción específica con la proteína diana. Realizamos un test de competitividad con los anticuerpos SQ17, DM17 y AL28 (Figura 3) y observamos que las isoformas OGT_{nc}, OGT_m y OGT_s se compiten. Sin embargo, el test de competitividad fue negativo para las isoformas de 65 KDa y 50 KDa. Los péptidos bloquearon las uniones específicas, por lo tanto la presencia de bandas suponemos que se debe uniones inespecíficas del anticuerpo.

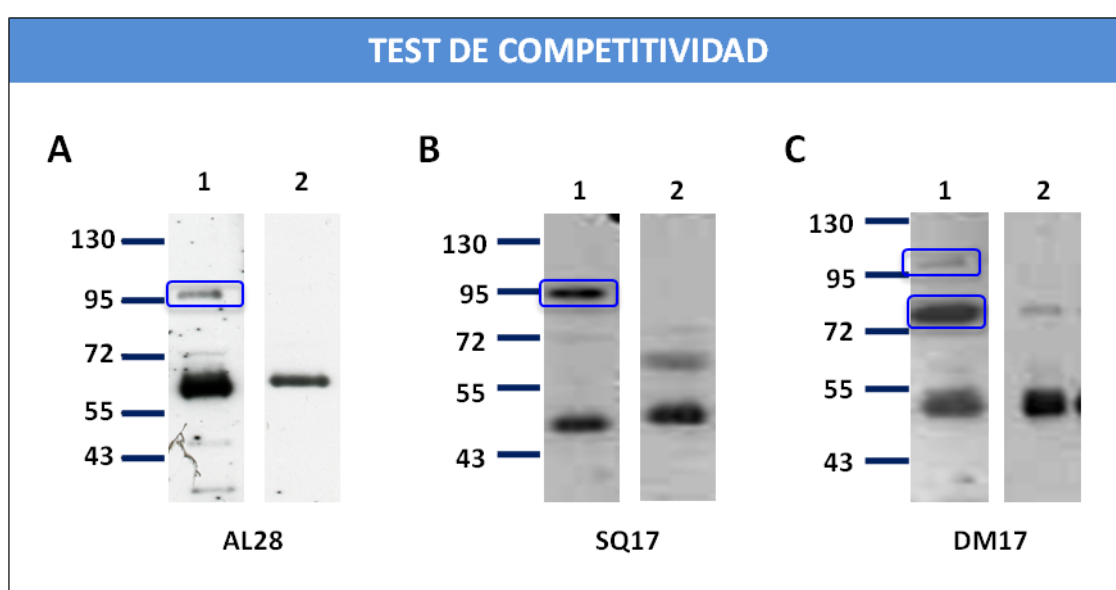


Figura 3. Test de competitividad en el cartílago articular artrósico. Western blot representativos (A.1) anti-OGT AL28, (A.2) anti-OGT AL28 preincubado con el péptido específico al28. (B.1) anti-OGT SQ17, (B.2) anti-OGT SQ17 preincubado con el péptido específico sq17. (C.1) anti-OGT DM17, (C.2) anti-OGT DM17 preincubado con el péptido específico dm17. El recuadro azul señala las isoformas competidas de OGT en cada caso.

Así como para OGT fue necesario seleccionar el anticuerpo más apropiado, por la amplia variedad de anticuerpos disponibles, no ocurrió lo mismo con la enzima OGA. Para esta enzima, no existen anticuerpos comerciales específicos disponibles. Nosotros utilizamos un anticuerpo elaborado y donado por el laboratorio de la Dra. Natasha Zachara (Universidad Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA). El anticuerpo anti-OGA 345, identificó las dos isoformas de OGA descritas en la literatura (OGA_L; OGA larga y OGA_S; OGA *short* o corta), en las muestras humanas testadas.

I.3.2 Síntesis de OGT y OGA en pacientes con artrosis.

Observamos una redistribución de las isoformas de OGT tanto en el cartílago como en los condrocitos aislados, de los pacientes artrósicos (Figura 4.A y 5.A, respectivamente). En el cartílago articular del grupo control, observamos las tres isoformas de OGT (OGT_{nc}, OGT_m y OGT_s) y no parece que ninguna fuera mayoritaria (Figura 4.A). Sin embargo, en el cartílago artrósico la síntesis de OGT_{nc} y OGT_m disminuía significativamente, mientras que OGT_s era la isoforma mayoritaria y su incremento estaba por encima de los 25 puntos, en comparación con el cartílago sano (Figura 4.A y C). Curiosamente, en los condrocitos aislados, la isoforma mayoritaria era la nucleocitoplásmica, en ambos grupos (Figura 5.A). Esta isoforma no presentaba diferencias significativas (Figura 5.C). Sin embargo, OGT_m y OGT_s aumentaban significativamente en los condrocitos aislados de los pacientes, en comparación con los donantes (Figura 5.C). La distribución de las isoformas de OGT, era diferente en el cartílago en comparación con los condrocitos aislados. Mientras que en el cartílago artrósico la isoforma mayoritaria era la OGT_s, en los condrocitos aislados la mayoritaria era la OGT_{nc}. Estos resultados sugerían la presencia de OGT extracelular. Tanto en el cartílago artrósico, como en los condrocitos aislados a partir del cartílago de los pacientes, la síntesis de OGT aumentaba netamente, a pesar de las redistribución de las isoformas.

En cuanto a OGA, en el cartílago total detectamos mediante western blot dos isoformas de la enzima descritas en la literatura: La isoforma larga (OGA_L) con un peso molecular estimado en 130 KDa y la isoforma *short* o corta (OGA_S) con un peso molecular estimado en 72 KDa (Comtesse N 2001; Wells L 2002; Butkinaree C 2008; Vocadlo DJ 2012). Observamos una disminución significativa de OGA_L en el cartílago articular de los pacientes artrósicos frente al grupo control. Por el contrario, la síntesis de OGA_S está incrementada en el cartílago articular del grupo OA (Figura 4.A y D). En cualquier caso, en el cartílago artrósico la síntesis de OGA aumentaba netamente. En los condrocitos aislados detectamos la isoforma OGA *short* o corta, pero esta no se modifica (Figura 5.A y D).

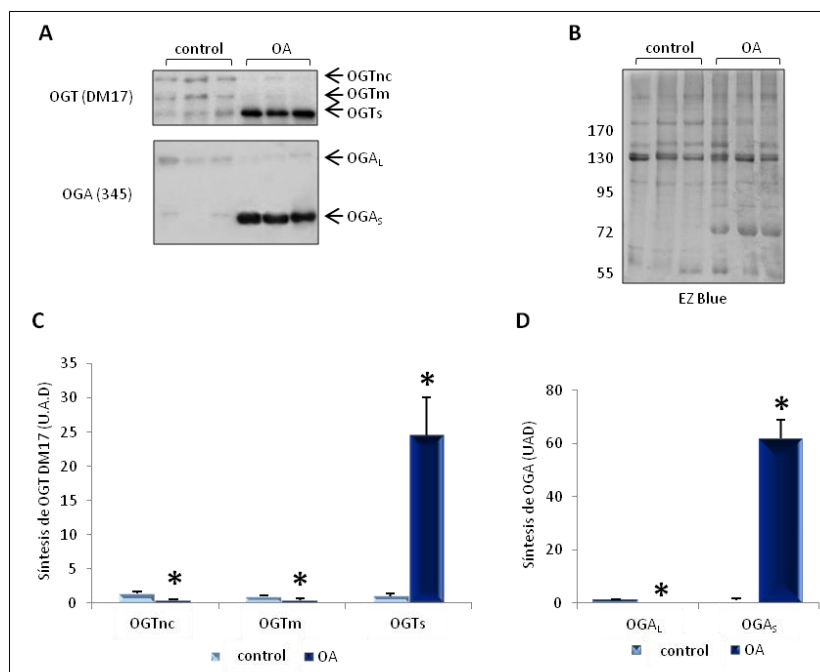


Figura 4. Síntesis de OGT y OGA en el cartílago articular humano. (A) Western blot representativo de las tres isoformas de OGT (OGTnc, OGTm y OGTS) y de las dos isoformas de OGA (OGA_L y OGA_S). (B) Tinción con EZ Blue utilizada como control de carga. (C y D) Análisis densitométrico de las isoformas de OGT y OGA respectivamente. Datos expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs. grupo control.

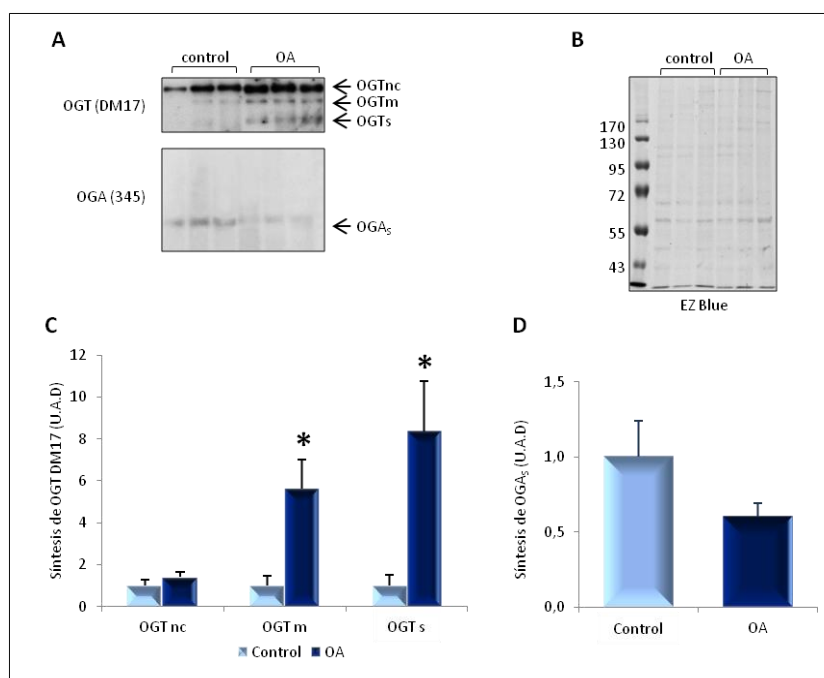


Figura 5. Síntesis de OGT y OGA en los condrocitos aislados humanos. (A) Western blot representativo de las tres isoformas de OGT (OGTnc, OGTm y OGTS) y de la isoformas corta de OGA (OGA_S). (B) Tinción con EZ Blue utilizada como control de carga. (C y D) Análisis densitométrico de las isoformas de OGT y OGA respectivamente. Datos expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs. grupo control.

I.3.3 Localización de OGT en el cartílago articular de pacientes con artrosis.

La diferencia en la distribución de las isoformas de OGT, entre el cartílago y los condrocitos aislados, en los pacientes artrósicos, nos sugirió la posibilidad de OGT tuviera un papel extracelular. Por este motivo, el siguiente objetivo consistió en localizar la síntesis de OGT en el cartílago, mediante inmunohistoquímica, para tratar de esclarecer el lugar de actuación de la enzima. Utilizamos el mismo anticuerpo con el que detectamos OGT mediante western blot: el anticuerpo comercial DM17. Además, realizamos un control negativo en el que se incubó previamente el anticuerpo con el péptido antigénico (dm17), para competir la región de unión con la enzima y asegurarnos que localizábamos específicamente OGT (Figura 6.C, F, H).

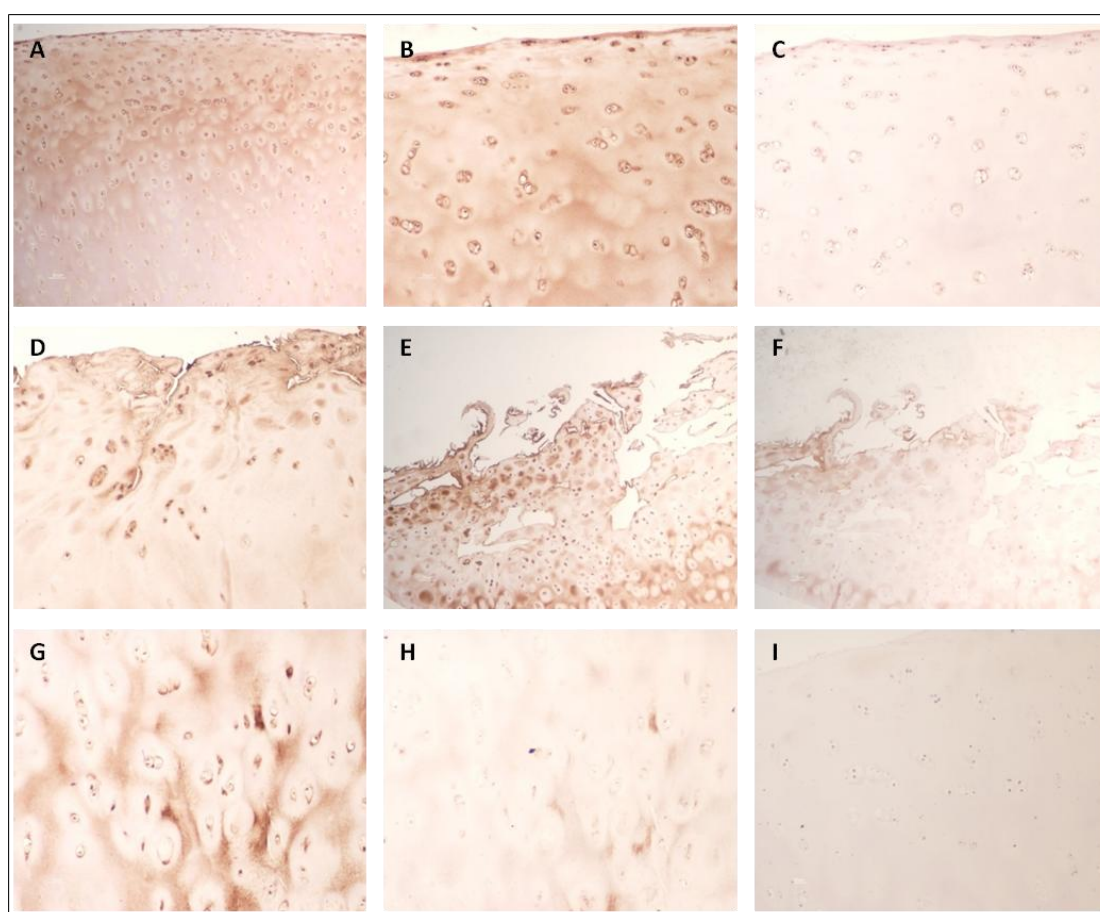


Figura 6. Localización de la enzima OGT en el cartílago articular. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica realizada en el cartílago articular del grupo control (A, B y C) y del grupo OA (D, E, F, G, H e I). Las imágenes A, B, D, E y G muestran la señal de OGT por incubación con el anticuerpo DM17. Las imágenes C, F y H muestran los controles de competitividad realizados con el péptido antigénico dm17. La imagen I muestra el control negativo del ensayo. Aumentos: A, D, E y F: 40x; B, C, G, H e I: 100x.

Como podemos observar en la figura 6, detectamos señal de OGT en el espacio intracelular y en la matriz extracelular, tanto en el grupo control como en el tejido de los pacientes OA. Esta técnica no es la más adecuada para cuantificar la señal. Sin embargo, a pesar de que todas las tinciones se han llevado a cabo en paralelo y han sido expuestas a DAB el mismo tiempo, parece que la señal intracelular del tejido OA (Figura 6.D, E, G) es más intensa que la señal del tejido sano (Figura 6.A, B). Además, observamos diferencias en cuanto a la distribución de la señal extracelular. Así, vemos que en el grupo control la señal está distribuida uniformemente por la matriz extracelular (MEC) mientras que en el tejido OA la señal parece concentrarse especialmente en torno a las clonas.

En cuanto a los controles negativos incubados con el péptido (Figura 6.C, F, H) observamos que la señal prácticamente desaparece. El anticuerpo tiene bloqueada por el péptido la región específica de unión a OGT. La ausencia de señal en los controles nos permite confirmar, que la señal que se observa dentro y fuera de las células es OGT.

I.4 Análisis de los marcadores de hipertrofia sintetizados en el cartílago articular de los pacientes con artrosis.

Los condrocitos artrósicos sufren un proceso de diferenciación que finaliza con la adquisición de un fenotipo hipertrófico que mantiene ciertas características del proceso de osificación endocondral. Así, estos condrocitos hipertróficos sintetizan entre otros marcadores, colágeno tipo X, anexina V y metaloproteasas (MMPs) que destruyen la MEC. Además, sabemos que el sistema de O-GlcNAcilación de proteínas se ha vinculado recientemente con la hipertrofia condrocitaria (Andrés-Bergós J 2012). En este apartado hemos analizado la síntesis de colágeno X y MMP-13 en el cartílago articular de los pacientes.

Observamos que la síntesis de MMP-13 y de colágeno X está incrementada significativamente en el cartílago de los pacientes OA. Confirmamos con este resultado, que los condrocitos del cartílago de nuestros pacientes sintetizan marcadores hipertróficos característicos de la enfermedad.

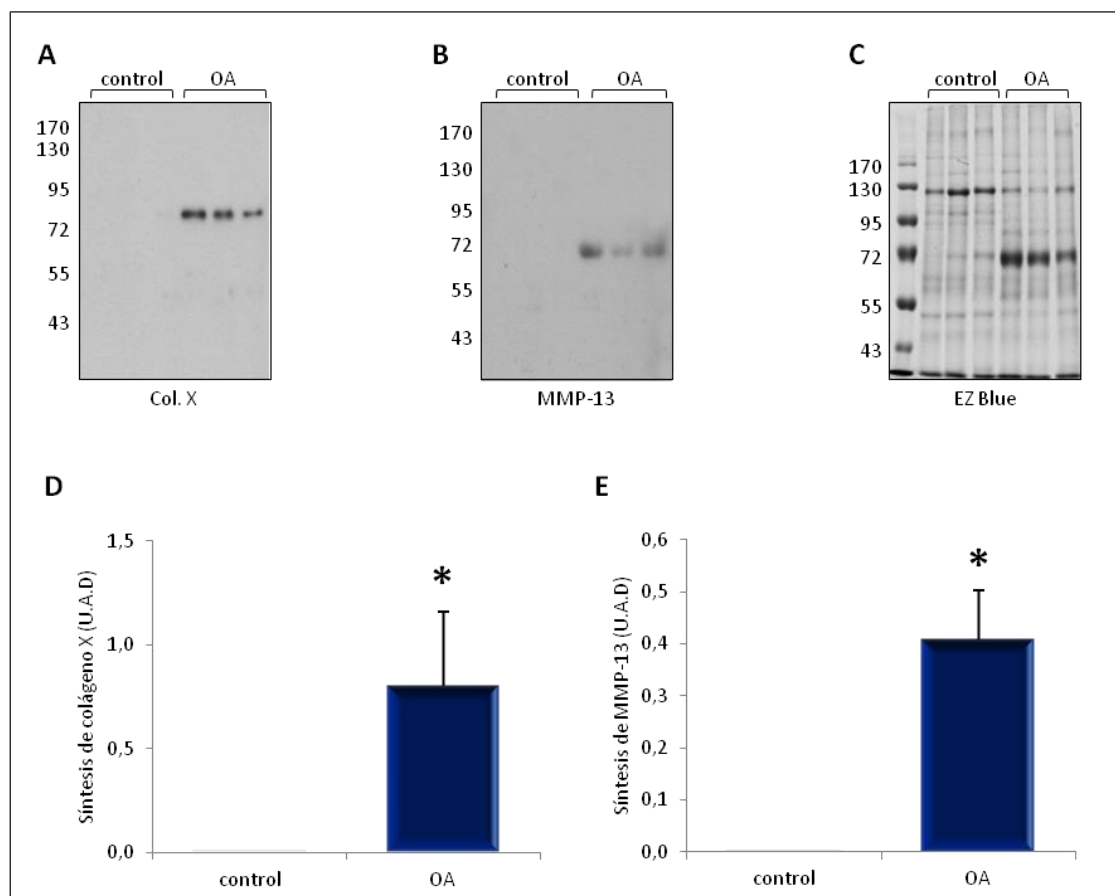


Figura 7. Síntesis de colágeno X y MMP-13 en el cartílago articular humano. (A) y (B) Western blot representativo de la síntesis de colágeno X y MMP-13, respectivamente. (D) y (E) Análisis densitométrico del colágeno X y MMP-13, respectivamente. (C) Tinción con EZ Blue utilizada como control de carga. Datos expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs. grupo control.

II. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL SISTEMA DE O-N-ACETILGLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS, EN CONDROCITOS OA HUMANOS *IN VITRO*, ESTIMULADOS CON LA CITOQUINA IL-1 α .

Tras comprobar que en el cartílago artrósico se acumulan proteínas O-GlcNAcizadas como resultado de la alteración de la síntesis de las enzimas OGT y OGA, quisimos analizar la respuesta del sistema O-GlcNAc ante un estímulo catabólico muy relevante en la OA. Utilizamos la citoquina IL-1 α , capaz de reproducir *in vitro*, las condiciones biológicas que se dan a nivel celular en la artrosis para estimular los condrocitos artrósicos humanos (COH).

II.1 Cuantificación de las proteínas O-GlcNAcizadas en COH estimulados con IL-1 α .

Con el objeto de relacionar la O-GlcNAcización de proteínas con los procesos asociados a la artrosis que tienen lugar en el cartílago, cuantificamos la acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas a diferentes tiempos en los COH estimulados con IL-1 α .

Observamos que la IL-1 α estimula la acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas, especialmente las proteínas con un peso molecular comprendido entre los 50 y 150 KDa. Además, la acumulación ocurre de manera tiempo-dependiente y la inducción máxima observada, ocurre a las 6 horas de la estimulación.

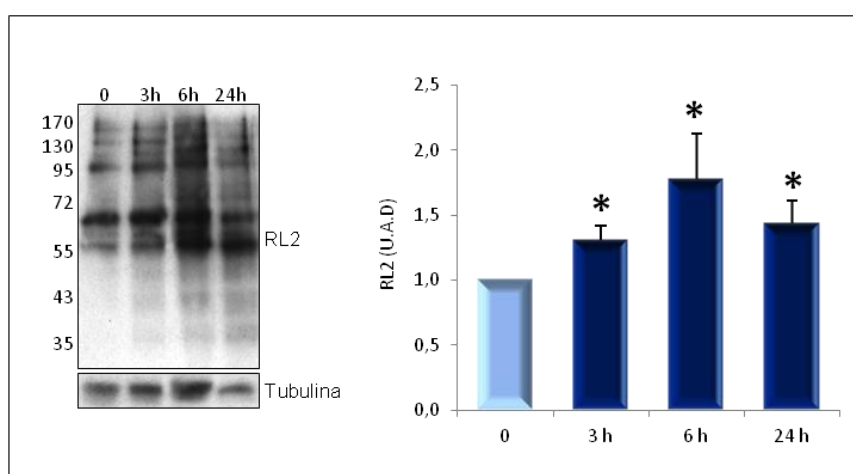


Figura 8. Patrón de proteínas O-GlcNAcizadas en COH estimulados con IL-1 α a diferentes tiempos. Western blot representativo y análisis densitométrico de las proteínas O-GlcNAcizadas detectadas con el anticuerpo. Datos expresados como media \pm EEM de 4 experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. tiempo 0.

II.2 Síntesis de las enzimas OGT y OGA en COH estimulados con IL-1 α .

En este apartado hemos analizado la regulación del sistema estudiando la síntesis de OGT y OGA en COH estimulados con IL-1 α .

Observamos que IL-1 α promueve la síntesis de las tres isoformas de OGT (OGT_{nc}, OGT_m y OGT_s) después de 3 horas de estimulación, aunque es a las 6 horas cuando determinamos la inducción máxima de la isoforma OGT_{nc} (Figura 9.A).

En el caso de OGA, IL-1 α induce la síntesis de ambas isoformas (OGA_L y OGA_S) después de 3 y 6 horas de estimulación. Sin embargo, tras 24 horas de estimulación con IL-1 α , la síntesis de OGA_L disminuye significativamente (Figura 9.B).

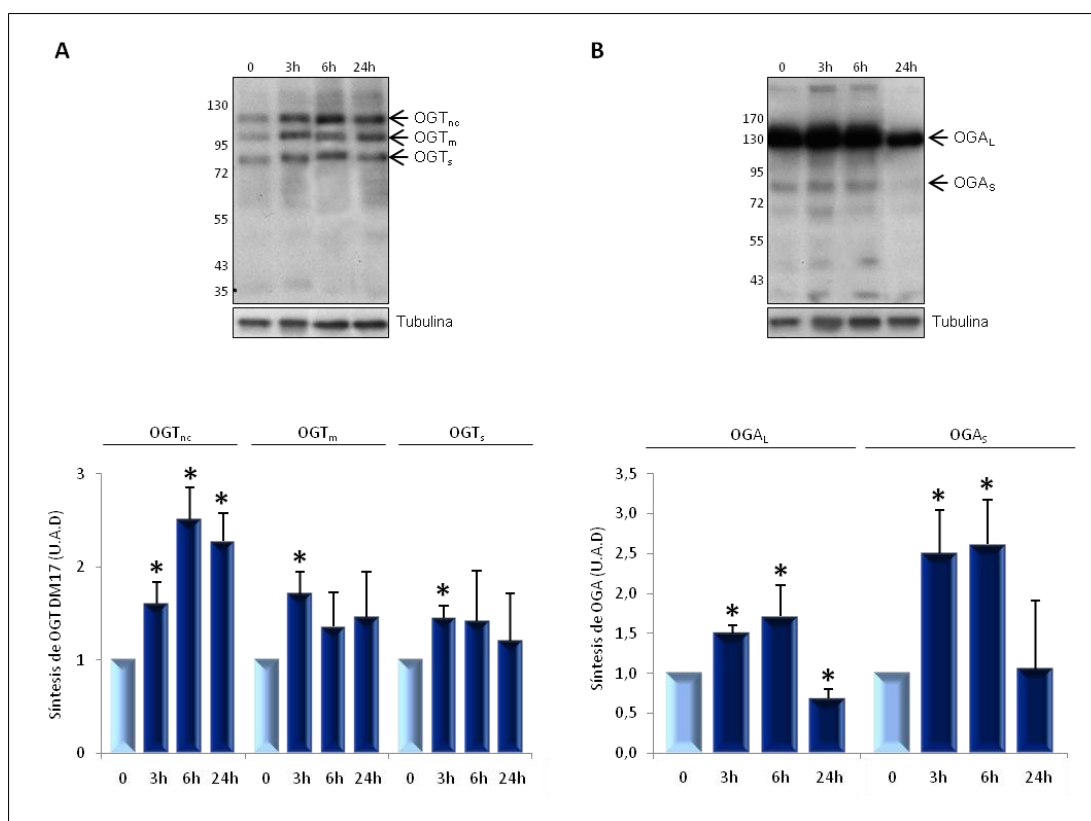


Figure 9. Síntesis de OGT (A) y OGA (B) en condrocitos artrósicos estimulados con IL-1 α a diferentes tiempos. Western blot representativo y análisis densitométrico de las tres isoformas de OGT, nucleocitoplásmica (OGT_{nc}), mitocondrial (OGT_m) y corta (OGT_s), y de las dos isoformas de OGA, larga (OGA_L) y corta (OGA_S). Datos expresados como media \pm EEM de 4 experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. tiempo 0.

III. ESTUDIO DEL SISTEMA DE O- β -N-ACETILGLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ARTROSIS EN CONEJO. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL SULFATO DE GLUCOSAMINA (SG) SOBRE LA O- β -N-ACETILGLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS, MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN ORAL Y PREVENTIVA A LOS CONEJOS ARTRÓICOS.

El sistema de O-GlcNAcilación de proteínas está claramente alterado en el cartílago artrótico humano. Además, demostramos en el apartado anterior, que dicho sistema puede ser regulado in vitro, por la citoquina catabólica IL-1 α , presente en las articulaciones artróticas.

En este apartado hemos utilizado un modelo experimental de artrosis inducida quirúrgicamente en conejo con dos objetivos: en primer lugar, analizar si podíamos reproducir la acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas observada en el cartílago articular de los pacientes, y en segundo lugar, estudiar si un incremento en el flujo de la ruta de las hexosaminas, inducido por la administración exógena de SG, era capaz de modificar la O-GlcNAcilación proteica, durante la artrosis experimental.

III.1 Modulación de la O-GlcNAcilación proteica durante la evolución de la artrosis.

El primer abordaje de este apartado consistió en analizar el sistema O-GlcNAc en tres etapas diferentes de la artrosis. Seleccionamos muestras de cartílago y de hueso subcondral, de conejos sacrificados en las semanas 3, 7 y 12, después de la cirugía de desestabilización articular. Se trata de un estudio preliminar, en el que sólo se incluyeron cinco conejos por grupo, con el fin de analizar las posibles diferencias en el sistema O-GlcNAc y determinar en qué etapa es más adecuado llevar a cabo el estudio. Además, estos conejos se utilizaron también para poner a punto las diferentes técnicas metodológicas empleadas, puesto que nunca antes se había estudiado el sistema O-GlcNAc, en los conejos.

III.1.1 Estudio del patrón de proteínas O-GlcNAcizadas durante la artrosis.

El patrón de proteínas O-GlcNAcizadas del cartílago articular, presentaba diferencias sutiles en las semanas 3 y 7 con respecto al grupo control (Figura 10.A). Dichas diferencias parecían

acentuarse en la semana 12. Observamos una mayor acumulación de proteínas entre los 50 y 60 KDa y entre los 100 y 130 KDa. Sin embargo, en ningún caso, la diferencia en la acumulación total de proteínas O-GlcNAcizadas en el grupo OA, fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control (Figura 10.A) aunque este hecho pudo deberse al número reducido de conejos utilizados en este estudio.

En el hueso subcondral observamos un patrón de O-GlcNAcizadas diferente al patrón observado en el cartílago y con muy pocas diferencias entre los grupos (Figura 10.B). La mayor parte de las proteínas O-GlcNAcizadas se acumulan en una banda definida en torno a los 100 KDa. Observamos otras dos bandas aproximadamente a 55 y 45 KDa. La cuantificación total de proteínas O-GlcNAcizadas, reveló la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, aunque una vez más parece que a las 12 semanas, la acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas tiende a ser mayor (Figura 10.B).

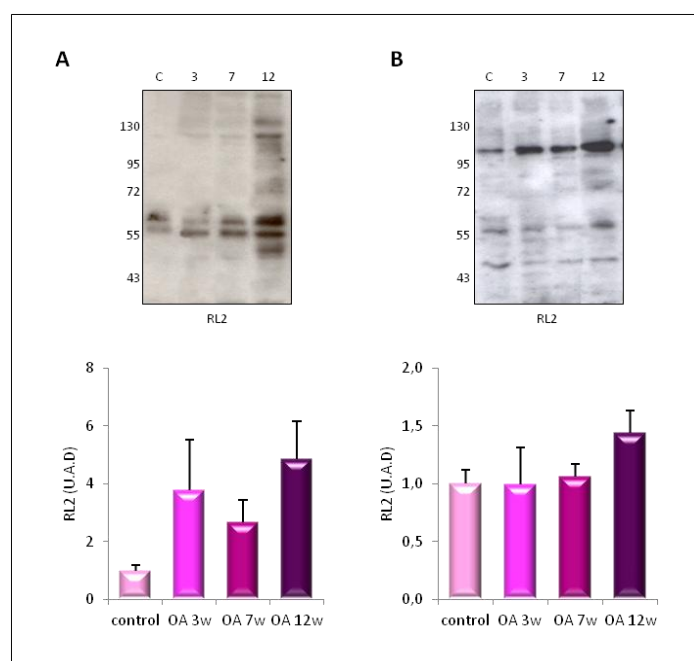


Figura 10. Patrón de proteínas O-GlcNAcizadas en el cartílago articular (A) y en el hueso subcondral (B) de conejos con artrosis de 3, 7 y 12 semanas de evolución. Western blot representativos y análisis densitométrico del área total de proteínas O-GlcNAcizadas detectadas con el anticuerpo RL2.

III.1.2 Síntesis de OGT y OGA durante la artrosis.

Analizamos los niveles de las enzimas reguladoras del sistema O-GlcNAc en el cartílago articular y en el hueso subcondral de los conejos.

Las isoformas de OGT nucleocitoplásmica (OGT_{nc}), mitocondrial (OGT_m) y corta (OGT_s), fueron detectadas tanto en el cartílago como en el hueso subcondral mediante la técnica de western blot con el anticuerpo comercial SQ17 (Figura 11). En el cartílago articular observamos un incremento significativo de OGT_m y OGT_s a las 3, 7 y 12 semanas con respecto al grupo control (Figura 11.A). En ambos casos, la acumulación de OGT parece aumentar con el avance de la enfermedad alcanzando su valor máximo a las 12 semanas. No observamos diferencias significativas de la OGT_{nc} sintetizada en el cartílago (Figura 11.A). Por el contrario, observamos un incremento significativo de OGT_{nc} en el hueso subcondral a las 3, 7 y 12 semanas (Figura 11.B). En este tejido la OGT_{nc} alcanzaba su valor máximo a las 3 semanas y posteriormente parecía disminuir. Sin embargo, a diferencia de lo que observamos en el cartílago OGT_m y OGT_s no se modifican en el hueso subcondral (Figura 11.B).

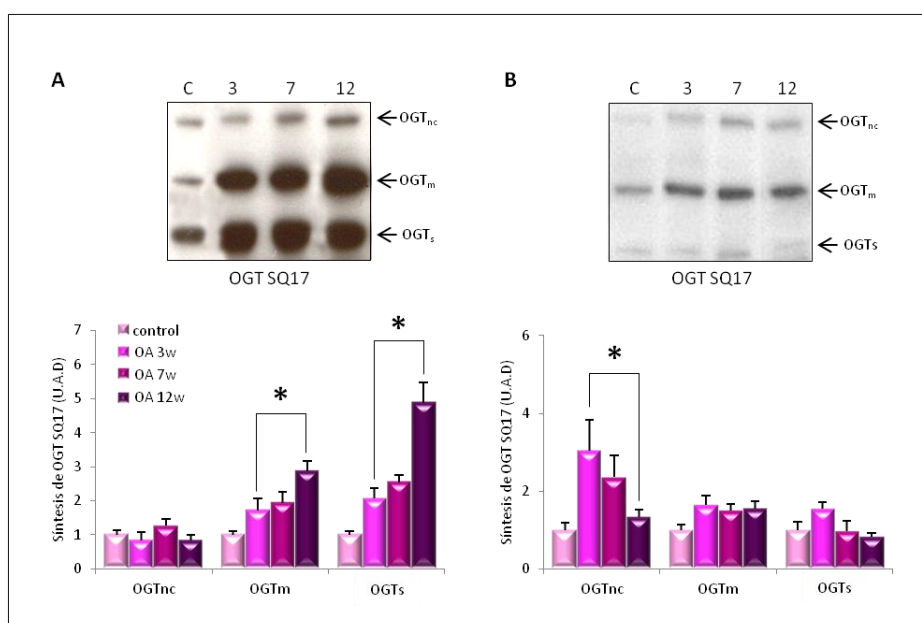


Figura 11. Síntesis de OGT en el cartílago articular (A) y en el hueso subcondral (B) de los conejos con artrosis de 3, 7 y 12 semanas de evolución. Western blot representativo y análisis densitométrico de las tres isoformas de OGT (OGT_{nc}, OGT_m y OGT_s). Datos expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs. grupo control.

En cuanto a la enzima OGA observamos la síntesis de las isoformas larga (OGA-L) y corta (OGA-S) en el cartílago articular (Figura 12.A). La isoforma OGA-L disminuye significativamente a las 3 y 12 semanas con respecto al grupo control. Sin embargo no observamos diferencias significativas en la semana 7 (Figura 12.A). Por el contrario la isoforma OGA-S, presentaba un incremento significativo en la semana 7 pero no se modificaba en la semanas 3 y 12 (Figura 12.A). En el hueso subcondral detectamos la isoforma OGA-L y observamos una inhibición significativa en la semana 7 (Figura 12.B). No observamos cambios significativos en las semanas 3 y 12 (Figura 12.B).

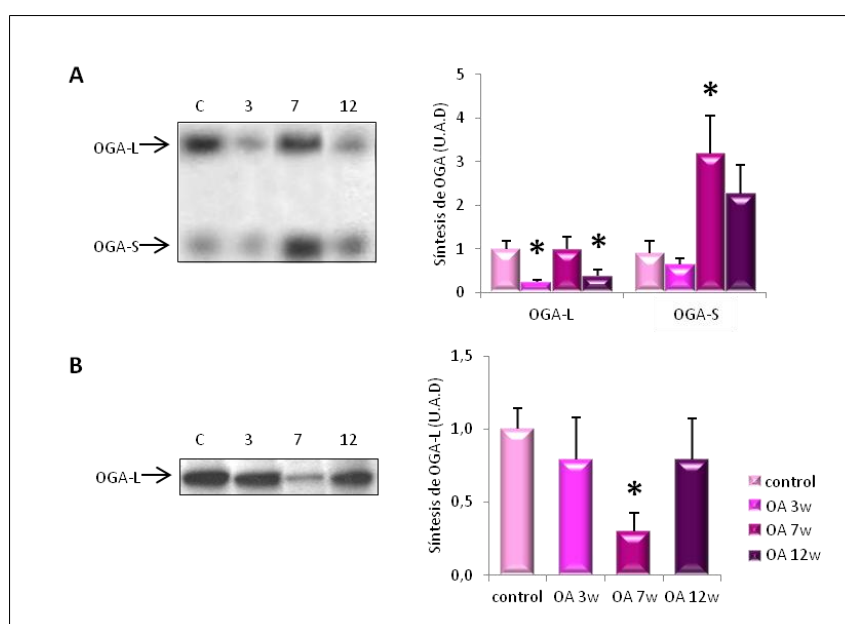


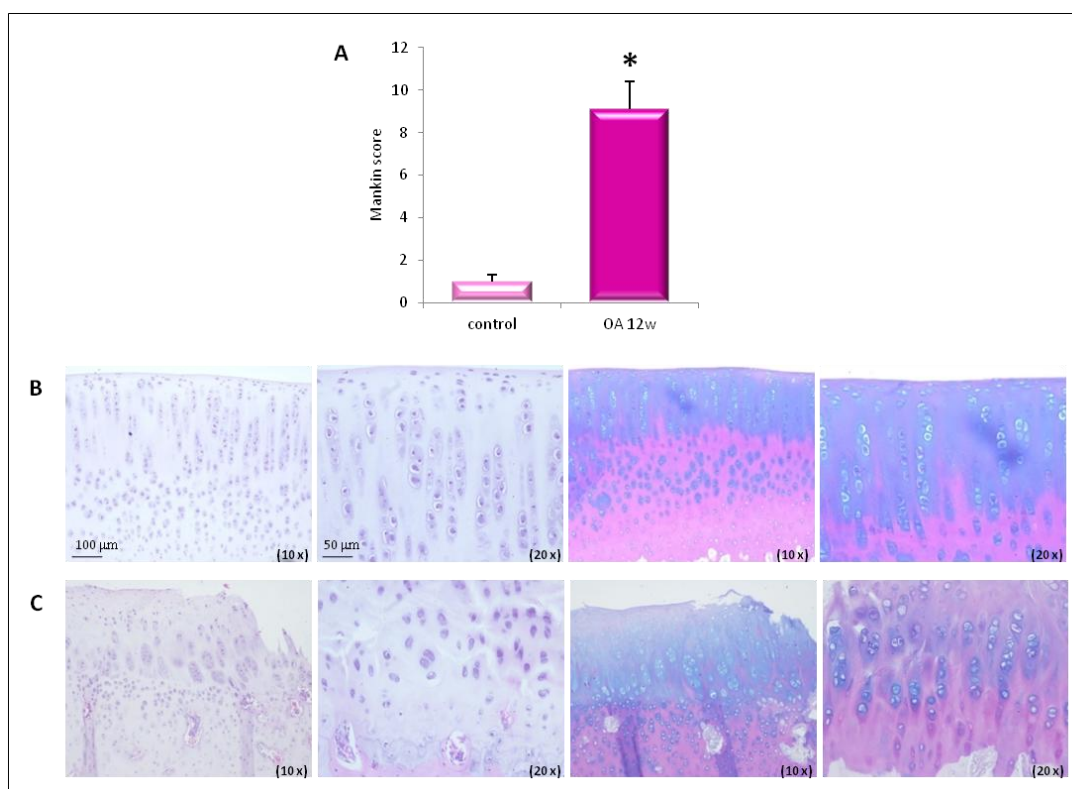
Figura 12. Síntesis de OGA en el cartílago articular (A) y en el hueso subcondral (B) de los conejos con artrosis de 3, 7 y 12 semanas de evolución. Western blot representativo y análisis densitométrico de las isoformas de OGA (OGA-L y OGA-S). Datos expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs. grupo control.

III.2 Alteraciones estructurales y moleculares de la articulación artrósica en el modelo experimental.

En este apartado estudiamos a nivel estructural y molecular las articulaciones de los conejos del modelo experimental y analizamos algunas de las alteraciones que ocurren en la artrosis. Seleccionamos las muestras de los conejos sacrificados a las 12 semanas, porque en el apartado anterior, observamos los cambios más destacados en el grupo sacrificado a las 12

semanas donde. En este apartado evaluamos el daño estructural y molecular en la artrosis experimental.

III.2.1 Histopatología del cartílago articular artrósico de los conejos.



En primer lugar, evaluamos la histopatología microscópica del cartílago articular de los conejos utilizando la escala de Mankin en cortes del cóndilo femoral teñidos con hematoxilina-eosina y azul alcian. En la figura 13.A representamos la puntuación global obtenida en la valoración histopatológica del cartílago articular artrósico según la escala de Mankin. Observamos un índice global significativamente más elevado en las rodillas del grupo OA.

Las rodillas del grupo OA 12w (Figura 13.C) presentaban alteraciones en la estructura, celularidad y en la tinción con azul alcian, que tiñe los proteoglicanos de la matriz. En cuanto a la estructura, las rodillas artrósicas presentaban irregularidades focales, con zonas de

desflecamiento, hendiduras y/o úlceras que alcanzaban la zona de transición y en los casos más agudos la zona calcificada. La celularidad se encontraba alterada por la presencia de clones y un aumento notable del número de células. Disminuía además la tinción de la matriz, lo que indicaba una pérdida de proteoglicanos. La limitante basófila se encontraba duplicada y en algunos casos triplicada en este grupo. Además, detectamos la presencia de vasos sanguíneos atravesándola e invadiendo el cartílago.

III.2.2 Estudio de los parámetros estructurales y pro-inflamatorios medidos en las rodillas de los conejos artrósicos.

En este apartado evaluamos tres parámetros estructurales y tres parámetros pro-inflamatorios para comprobar que la artrosis inducida quirúrgicamente en los conejos es similar, en cuanto a activación de marcadores pro-inflamatorios y catabólicos, a la que presentan los pacientes artrósicos.

- Análisis de los parámetros estructurales medidos en cartílago y hueso subcondral de las rodillas de los conejos artrósicos.

El equilibrio entre la síntesis de OPG y la síntesis de RANKL regula la diferenciación y activación de los osteoclastos. RANKL, es una citoquina esencial para la activación osteoclástica y junto con su recetor RANK y el receptor señuelo OPG, modulan la resorción ósea y la homeostasis del hueso en general (Hofbauer LC 2001; Boyle WJ 2003). El sistema OPG/RANK/RANKL es el principal regulador del remodelado óseo, aunque también se expresa en condrocitos (Kwan Tat S 2009). Nuestro laboratorio demostró hace algunos años, que en el cartílago artrósico humano, existe un incremento en la síntesis de RANKL (Moreno-Rubio J 2010). Observamos tanto en el cartílago como en el hueso subcondral de los conejos artrósicos, una disminución significativa del ratio OPG/RANKL que se traduce en un proceso de resorción ósea en la articulación (Figura 14. A).

Además, observamos un incremento en la síntesis de MMP-3 y MMP-13 en el cartílago de los conejos artrósicos (Figura 14.B y C, respectivamente), en comparación con el grupo control. Ambas metaloproteinasas son responsables de la destrucción de la MEC del cartílago. En el

hueso subcondral de los conejos artrósicos, observamos un incremento de la MMP-3 mientras que la MMP-13 no variaba significativamente (Figura 14.B y C, respectivamente), con respecto a los conejos sanos.

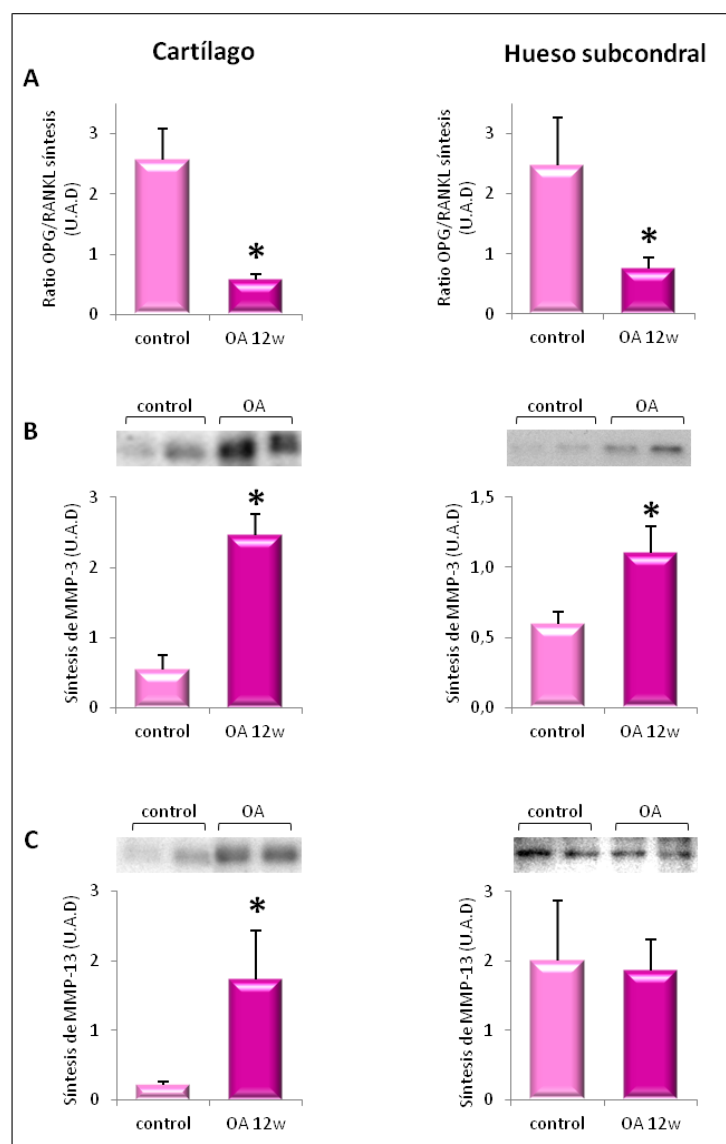


Figura 14. Estudio de los parámetros estructurales en cartílago y hueso subcondral de las rodillas de conejos OA. (A) Ratio de la síntesis proteica de OPG/RANKL. (B y C) Western blot representativos y análisis densitométricos de MMP-3 y MMP-13, respectivamente. Datos expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs. grupo control.

- Análisis de los parámetros pro-inflamatorios medidos en el cartílago de los conejos artrósicos.

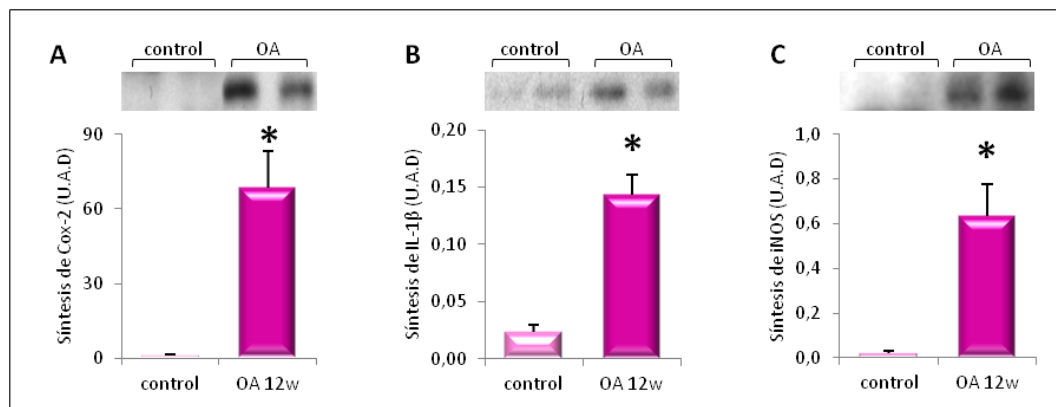


Figura 15. Síntesis de los marcadores pro-inflamatorios en el cartílago de los conejos artrósicos. Western blot representativo y análisis densitométrico de (A) Cox-2, (B) IL-1β e (C) iNOS. Datos expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs. grupo control.

La evolución de la artrosis está vinculada a la síntesis de citoquinas y otros factores moduladores de la respuesta inflamatoria. En nuestro modelo experimental, hemos analizado tres de los marcadores pro-inflamatorios más comunes: Cox-2, IL-1β e iNOS, para demostrar que también en este sentido, se reproduce la expresión observada en el cartílago de los pacientes con artrosis.

Observamos un incremento de la síntesis de Cox-2, IL-1β e iNOS en el grupo OA 12w con respecto al grupo control (Figura 15.A, B y C respectivamente).

Por lo tanto, hemos demostrado que el modelo experimental de artrosis inducida en conejo reproduce las características estructurales y moleculares propias de la enfermedad en humanos. Hemos observado, que la pérdida de cartílago articular estaba acompañada de una alteración de los mediadores catabólicos y un incremento de los marcadores pro-inflamatorios.

III.3 Efecto del sulfato de glucosamina (SG) sobre la modulación del sistema O-GlcNAc y otras alteraciones del cartílago artrósico, en el modelo experimental.

El objetivo de este apartado, consistió en estudiar si en el modelo animal se reproduce la alteración en el sistema O-GlcNAc observada en los pacientes artrósicos. El segundo objetivo, consistió en estudiar el efecto del incremento en el flujo de la ruta HBP sobre el sistema O-GlcNAc, mediante la administración de SG, en los conejos artrósicos.

III.3.1 Histopatología del cartílago articular del modelo experimental de conejos.

Una parte de los conejos artrósicos tomó SG desde dos semanas antes de la cirugía y hasta el momento del sacrificio, doce semanas después de la operación. El SG se utiliza habitualmente en el tratamiento de la artrosis por su capacidad para reducir el dolor y los síntomas que acompañan a la enfermedad.

Evaluamos la histopatología microscópica del cartílago articular de los conejos utilizando la escala de Mankin en cortes del cóndilo femoral teñidos con hematoxilina-eosina y azul alcian. En la figura 16.A representamos la puntuación global obtenida en la valoración histopatológica del cartílago articular según la escala de Mankin. Observamos un índice global significativamente más elevado en las rodillas del grupo OA en comparación con el grupo control. Sin embargo, la administración de SG revierte ese incremento hasta alcanzar valores significativamente inferiores con respecto al grupo OA.

Las rodillas del grupo OA 12w (Figura 16.C) presentaban alteraciones en la estructura, celularidad y en la tinción con azul alcian de la matriz. La limitante basófila se encontraba duplicada y en algunos casos triplicada y detectamos la presencia de vasos sanguíneos atravesándola e invadiendo el cartílago.

Al observar las rodillas del grupo OA 12w+SG (Figura 16.D) comprobamos que la estructura del cartílago apenas presentaba alteraciones. Sin embargo, la celularidad y la tinción de la matriz presentaban un aspecto diferente al grupo control, aunque en ningún caso observamos el daño presente en el grupo OA 12w. La limitante basófila presentaba un aspecto normal y en raras ocasiones observamos invasión de los vasos sanguíneos hacia el cartílago. En definitiva y en vista de los resultados obtenidos en la puntuación global del Mankin, confirmamos que la

administración de SG previene el daño estructural ocasionado por la evolución de la artrosis en el cartílago articular.

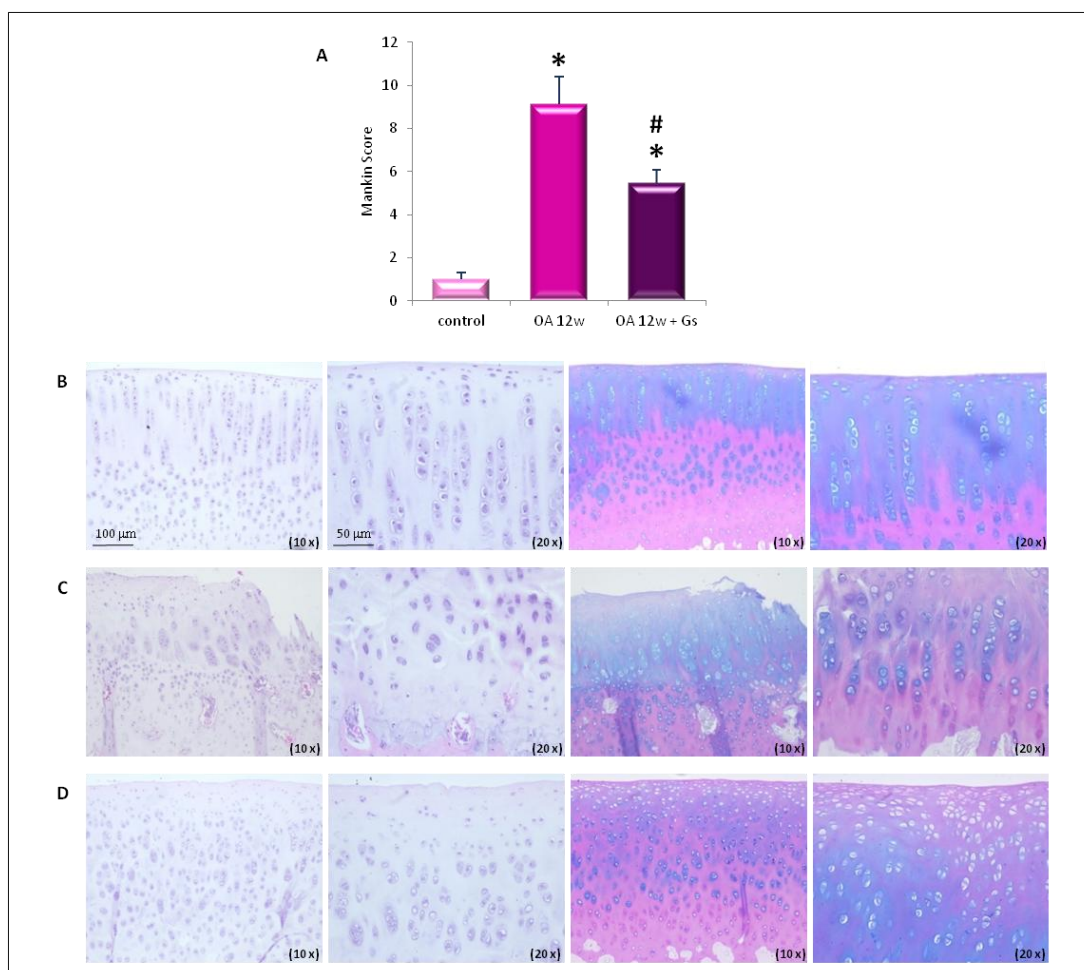


Figura 16. Histopatología del cartílago articular de los conejos. (A) Puntuación global del daño según la escala de Mankin. (B, C y D) Imágenes representativas de los cartílagos del grupo *control*, *OA 12w* y *OA 12w+SG*, respectivamente. Tinciones de hematoxilina-eosina y azul alcian. Escala y aumentos descritos sobre las imágenes. Datos expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs. grupo control. # $p < 0.05$ vs. grupo *OA 12w*.

III.3.2 Modulación del sistema de O-GlcNAcilación de proteínas en el modelo experimental.

- Estudio del patrón de proteínas O-GlcNAcizadas.

Analizamos el patrón de proteínas O-GlcNAcizadas mediante western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente esta modificación: el anticuerpo RL2. Se utilizaron

extractos de proteína total del cartílago articular de los conejos del grupo *control*, *OA 12w* y *OA 12w+SG*.

Observamos en la figura 17.B una distribución de las proteínas O-GlcNAcadas similar al patrón observado en el cartílago humano (Figura 1.B). La mayoría de las proteínas O-GlcNAcadas se detectaron en el rango entre de 120 y 170 KDa y entre 45 y 70 KDa. Observamos una mayor acumulación de proteínas O-GlcNAcadas en el grupo *OA 12w* (Figura 17.B). La cuantificación de las proteínas totales medidas por carriles reveló una acumulación significativa de proteínas O-GlcNAcadas en el grupo *OA 12w* (Figura 17.A). Estos datos reproducen y corroboran los resultados observados en humanos.

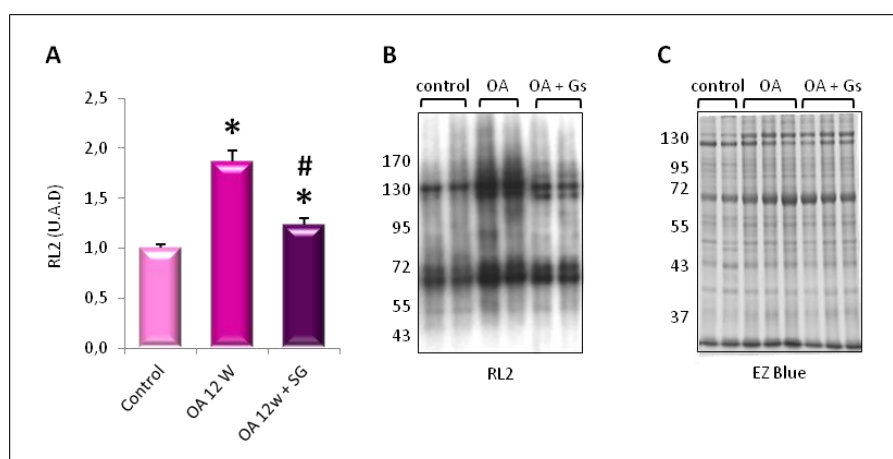


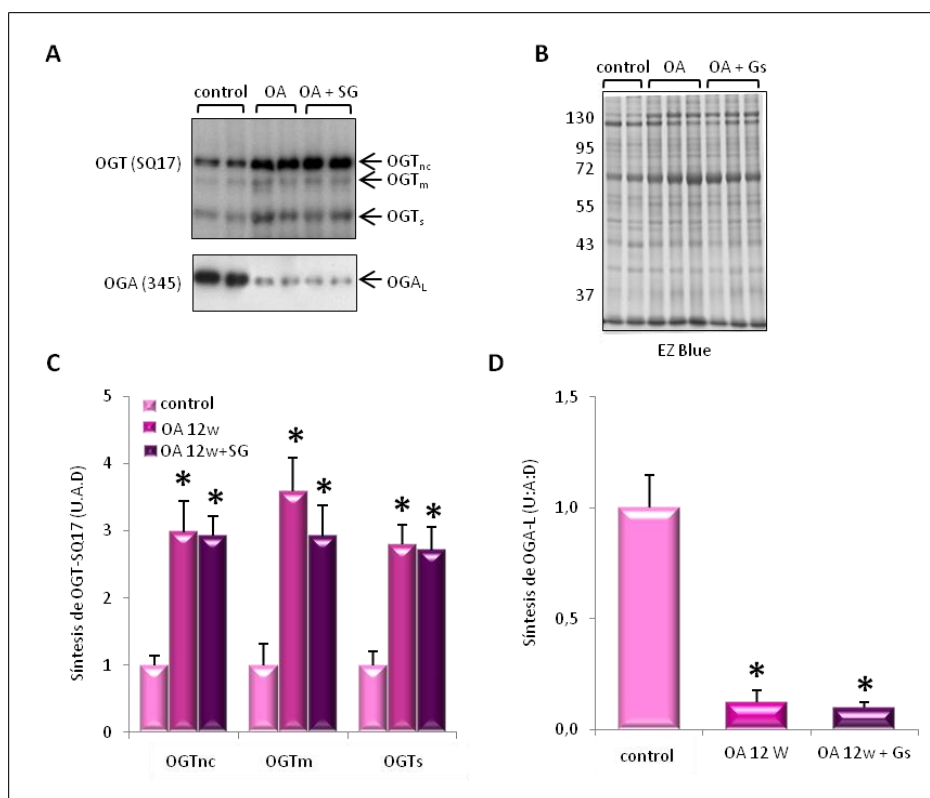
Figura 17. Patrón de proteínas O-GlcNAcadas en el cartílago articular de los conejos. (A) Análisis densitométrico del área total y (B) western blot representativo de las proteínas O-GlcNAcadas detectadas con el anticuerpo RL2. (C) Tinción con EZ Blue utilizada como control de carga. Datos expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs. grupo control. # $p < 0.05$ vs. grupo *OA 12w*.

La acumulación de proteínas O-GlcNAcadas cuantificada en el grupo *OA 12w+SG*, es significativamente mayor que en el grupo control. Sin embargo, en comparación con el grupo *OA 12w* observamos una disminución significativa de la síntesis de proteínas O-GlcNAcadas (Figura 17.A).

- Análisis de las enzimas OGT y OGA.

Analizamos la síntesis de OGT y OGA mediante western blot utilizando los anticuerpos SQ17 y anti OGA-345. Estos anticuerpos reconocen de manera específica una secuencia de OGT y OGA, respectivamente. El SQ17 identificó en conejos, las 3 isoformas descritas en la literatura

para humanos (OGT_{nc}, OGT_m y OGT_s). El anti OGA-345 detectó la isoformas OGA_L. Utilizamos extractos de proteína total obtenidos a partir del cartílago articular de los conejos del grupo *control*, *OA 12w* y *OA 12w+SG*.



En el cartílago articular observamos un incremento significativo de la síntesis de las tres isoformas de OGT en los conejos *OA 12w* (Figura 18.C). Comprobamos que el SG no fue capaz de revertir dicho incremento. La síntesis de OGT se incrementó significativamente en los conejos que habían sido tratados con este compuesto, con respecto al grupo *control* (Figura 18.C). Observamos que la isoforma mayoritaria en el cartílago articular sería la nucleocitoplásmica, siendo la síntesis de OGT_m y OGT_s menos abundante (Figura 18.A).

Los resultados de la síntesis de OGA en el grupo *OA 12w* describieron un patrón similar al observado en humanos (Figura 4.D). Observamos una inhibición significativa de la síntesis de OGA_L en el cartílago articular artrósico del modelo experimental (Figura 18.A y D). De nuevo, el

SG no tuvo ningún efecto sobre la síntesis de esta enzima (Figura 18.A y D). La isoforma Corta de OGA (OGA_S) no se detectaba en el tejido de los conejos.

III.3.3 Modulación de la inflamación en el modelo experimental de artrosis: estudio de la síntesis de Cox-2.

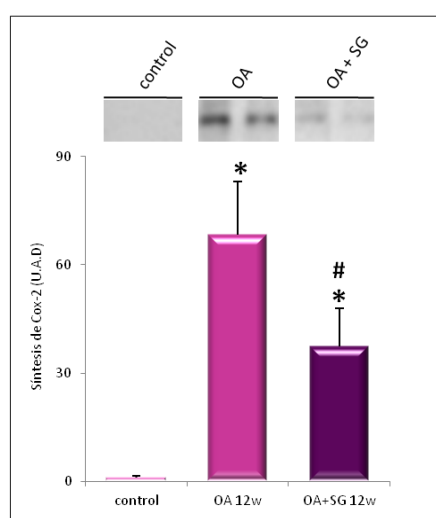


Figura 19. Síntesis de la COX-2 en el cartílago de los conejos. Western blot representativo y análisis densitométrico de los resultados. Datos expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs. grupo control. # $p < 0.05$ vs. grupo OA 12w.

Sabemos por la literatura que el SG es capaz de modificar la síntesis de determinados marcadores pro-inflamatorios en modelos animales, que cursan con inflamación (Largo R 2009). Nos planteamos la posibilidad de que este fármaco estuviera actuando sobre el sistema O-GlcNAc a través de la modificación del componente inflamatorio. En este apartado estudiamos el efecto del SG sobre la síntesis de Cox-2. Observamos una disminución significativa de la síntesis de Cox-2 en los conejos que habían consumido SG, en comparación con el grupo OA 12w. El SG inhibía la síntesis de Cox-2 en los conejos artrósicos (Figura 19).

III.3.4 Estudio del factor de transcripción NF- κ B en el modelo experimental de conejos.

Hemos observado que, en el modelo experimental de artrosis, la administración de un compuesto que incrementa el flujo a través de la ruta HBP, es capaz de prevenir el desarrollo de lesiones histopatológicas en el cartílago, en comparación con los animales sin tratar. Además, este compuesto fue capaz de disminuir la síntesis de mediadores pro-inflamatorios, como COX-2. A su vez, la administración de SG disminuyó significativamente la cantidad de proteínas O-GlcNAcadas.

Nuestro siguiente objetivo consistió en estudiar el efecto del SG sobre la actividad del factor de transcripción nuclear κ B. (NF- κ B). Como se ha descrito en la introducción, este factor regula la expresión génica de diferentes enzimas degradadoras de la matriz extracelular, como MMP-1 y MMP-3, y de algunos mediadores pro-inflamatorios, como COX-2, iNOS, etc. Además, algunas de las proteínas que forman parte del monodímero activo de NF- κ B, es capaz de O-GlcNAcarse.

En primer lugar, analizamos la actividad del NF- κ B mediante un ensayo de EMSA en el cartílago de los conejos. Observamos un incremento de NF- κ B en el grupo OA 12w con respecto al grupo control. El grupo OA 12w+SG no presentaba diferencias significativas con respecto al grupo control. Sin embargo, la actividad del NF- κ B estaba atenuada significativamente en los conejos que habían recibido SG, con respecto a los artrósicos (Figura 20).

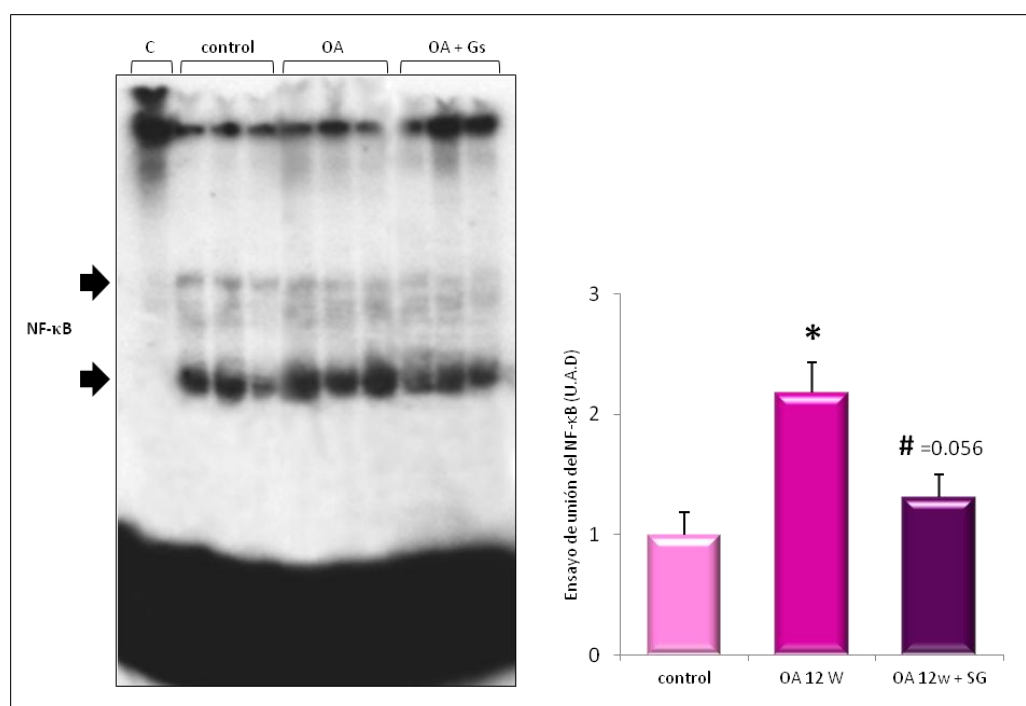


Figura 20. Actividad del factor de transcripción NF- κ B medida en los condrocitos aislados del cartílago articular de los conejos. Ensayo de EMSA representativo y análisis densitométrico de los resultados. Datos expresados como media \pm EEM. * $p<0.05$ vs. grupo control. # $p<0.05$ vs. grupo OA 12w.

IV. ESTUDIO DEL EFECTO DEL SG SOBRE LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL NF- κ B A TRAVÉS DE LA MODIFICACIÓN DE LA O-N-ACETILGLICOSILACIÓN DE LA SUBUNIDAD P65, EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ARTROSIS EN CONEJO.

La capacidad del SG de modular el componente inflamatorio, mediante la disminución de la actividad del NF- κ B en el cartílago de los conejos artrósicos, nos hizo plantearnos la posibilidad de que esta modulación pudiera ocurrir a través de la modificación de la O-GlcNAcilación del NF- κ B.

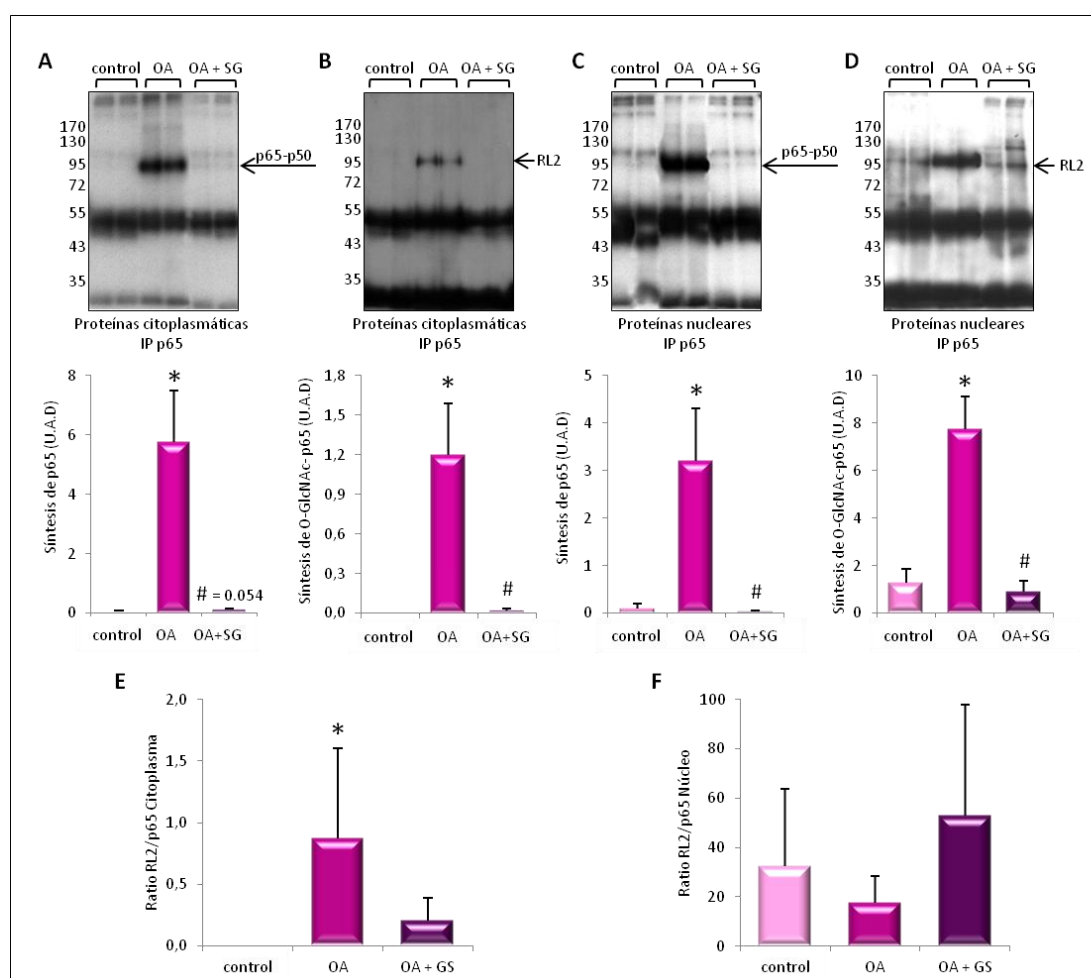


Figura 21. Modificación de la O-GlcNAcilación de p65 en los condrocitos del cartílago de los conejos. Western blot representativo y análisis densitométrico de la síntesis (A y C) y de la O-GlcNAcilación (B y D) de p65, medido en proteínas citoplasmáticas y nucleares. (E y F) Ratio de O-GlcNAc-p65/p65 (RL2/p65) en el citoplasma y en el núcleo respectivamente. Datos expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs. grupo control. # $p < 0.05$ vs. grupo OA 12w.

El objetivo de este apartado fue analizar el efecto del SG sobre la O-GlcNAcilación de p65 en el cartílago de los conejos artrósicos que consumieron SG y relacionar dicho efecto con la inhibición parcial de la actividad del NF- κ B, observada en el modelo.

IV.1 Estudio de la O-GlcNAcilación de la subunidad p65 de NF- κ B.

Analizamos la O-GlcNAcilación de p65 inmunoprecipitando la subunidad con el anticuerpo comercial anti-p65. El precipitado lo corrimos en dos geles de agarosa e hibridamos las membrana tras la transferencia, con el anticuerpo anti-p65 y con el anticuerpo RL2. El anti-p65 lo utilizamos como control para confirmar que el precipitado era p65. Con el RL2 detectamos y cuantificamos por densitometría la O-GlcNAcilación de p65. Este ensayo se hizo en proteínas nucleares y citoplásmicas obtenidas de los condrocitos aislados a partir del cartílago articular de los conejos del modelo experimental.

En la figura 21 A y C, observamos los western blots representativos de p65. Con esta técnica, detectamos el dímeros p65-p50. Sin embargo, los monómeros quedan ocultos por la banda inespecífica que aparece a la altura del marcador de 55 KDa.

IV.1.1 Estudio de la O-GlcNAcilación de p65 en el citoplasma de los condrocitos.

Observamos un incremento tanto de la síntesis como de la O-GlcNAcilación de p65 en el grupo OA 12w. Los condrocitos de los conejos que habían recibido SG presentaban una inhibición de la síntesis de p65 (Figura 21. A y B). Para determinar y comparar entre los tres grupos del modelo la cantidad de p65 que se O-GlcNAcila, analizamos el ratio de O-GlcNAc-p65 entre p65, en cada grupo (Ratio RL2/p65). En primer lugar, nos encontramos con una dificultad matemática a la hora de normalizar los datos. En algunos casos dentro del grupo de los conejos sanos, el resultado de la densitometría de RL2, era cero. Con estos datos, no pudimos normalizar el resto de los resultados en función del grupo control y analizamos los valores absolutos. Tal y como se aprecia en la figura 21 E y F, esta dificultad nos dio como resultado una gráfica con errores absolutos muy elevados.

En el citoplasma observamos que el ratio RL2/p65 estaba incrementado significativamente en los conejos artrósicos, con respecto a los sanos. Los conejos del grupo *OA 12w+SG*, parecen tener un ratio RL2/p65 disminuido, con respecto al grupo *OA 12w* (Figura 21.E). Podemos decir que el poco p65 que se acumulaba en el citoplasma de los conejos que recibieron SG, podría estar más O-GlcNAcylado con respecto a los sanos, pero no con respecto a los conejos artrósicos.

IV.1.2 Estudio de la O-GlcNAcylación de p65 en el núcleo de los condrocitos.

Observamos, al igual que en el citoplasma, un incremento tanto de la síntesis como de la O-GlcNAcylación de p65 en el núcleo de los condrocitos del grupo *OA 12w* y la inhibición de la síntesis de p65 en los condrocitos de los conejos que habían recibido SG (Figura 21.C y D). Sin embargo, el ratio RL2/p65 en el núcleo de los condrocitos del grupo *OA 12w* estaba disminuido con respecto al grupo *control* y sorprendentemente también con respecto al grupo *OA 12w+SG* (Figura 21.F). Observamos, que los conejos que habían recibido SG, presentaban un ratio RL2/p65 mayor que los conejos artrósicos, y aunque en menor medida, parecía que era también más elevado que en el grupo control. Este dato pone de manifiesto que la O- β -N-acetilglucosilación de p65 en el núcleo, podría ser la causa de la atenuación de la actividad del NF- κ B, observada en el apartado III.3.4 de esta tesis, en los conejos tratados con SG (Figura 21).

V. DISCUSIÓN

I. ESTUDIO DE LA O- β -N-ACETILGLICOSILACIÓN EN LA ARTROSIS HUMANA.

La O-GlcNAcilación proteica ha sido descrita como una modificación postraducciona esencial para la regulación de las funciones celulares. Cientos de proteínas de diversos grupos funcionales, como proteínas asociadas a cromatina, factores de transcripción, proteínas del proteosoma, proteínas del citoesqueleto, quinasas o enzimas metabólicas, son susceptibles de ser modificadas por este residuo. Se trata de una modificación dinámica, regulada por la actividad catalítica de las enzimas O-GlcNAc transferasa (OGT) y O-GlcNAcase (OGA), en respuesta a la concentración de nutrientes, estrés y otros estímulos extracelulares (revisado en (Copeland RJ 2013)). La O-GlcNAcilación es funcionalmente similar al proceso de fosforilación y se ha demostrado que juega un papel importante en numerosos procesos biológicos, que incluyen la señalización celular, procesos de transcripción e incluso es determinante en la etiología de algunas enfermedades (Slawson C 2006; Zachara NE 2006). Por ejemplo, en el caso de la RNA polimerasa II, los grupos fosfato y GlcNAc compiten por los mismos sitios de unión y su actividad parece estar determinada por esta competencia (Kelly WG 1993). Otro ejemplo es la O-GlcNAcilación del factor de transcripción SP1, que disminuye su actividad transcripcional al impedir que este se una a su complejo transcripcional de proteínas (Yang X 2001), o la quinasa GSK-3 β , que forma parte de la ruta de las MAPKs y está implicada en la diferenciación condrocitaria (Kawasaki Y 2008), es un sustrato específico de la enzima OGT (Hanover JA 2001). Desde los años 90, las alteraciones en el proceso de O-GlcNAcilación proteica, se han asociado con enfermedades crónicas y relacionadas con la edad como la diabetes, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares o el cáncer (Bond MR 2013; Copeland RJ 2013). Nosotros hemos descrito una acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas en el cartílago artroscópico humano, que podría deberse al menos en parte, a una alteración de la síntesis de las enzimas OGT y OGA. Es la primera vez que se describe una activación del sistema O-GlcNAc en el cartílago, asociada a una patología articular humana.

Conocemos dos tipos de alteraciones en el sistema O-GlcNAc que desencadenan respuestas celulares diferentes. Se trata de alteraciones transitorias o por el contrario, crónicas. En el caso de las primeras, diferentes estudios in vitro e in vivo han demostrado, que un incremento en la O-GlcNAcilación total, es un mecanismo de protección para la célula en respuesta a un daño agudo (Zachara NE 2004 b). La acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas en condiciones patológicas transitorias, se ha relacionado con la respuesta adaptativa de supervivencia celular, frente a situaciones de estrés agudo, como el calor, la privación de glucosa, hipoxia, estrés oxidativo, lesión vascular aguda, isquemia o trauma (Hart GW 2011; Zachara NE 2012). Se ha sugerido, que el sistema O-GlcNAc podría mediar en la tolerancia celular frente al estrés,

a través del aumento en los niveles de las proteínas *heat shock* (HSPs), concretamente HSP70 y HSP40, que se inducen en respuesta a un daño celular (Zachara NE 2004 b). Además, la O-GlcNAcilación se ha relacionado con la estabilización de la estructura de algunas proteínas, como la fucosa (Mer G 1996), con la prevención de la formación de agregados proteicos (Lefebvre T 2001) o con la modulación de algunas rutas de señalización implicadas en el metabolismo de la glucosa, como es el caso de la activación de JNK (Moley KH 2000). Sabemos por la literatura, que las células responden a diferentes formas de estrés, incrementando el transporte de glucosa, porque este proceso aumenta la supervivencia celular ya que permite mantener los niveles de ATP y el potencial de membrana mitocondrial. Un descenso en el transporte de glucosa, da lugar a una situación de estrés oxidativo que cambia el estado redox de las células y en situaciones de hipoglucemia/hipoxia se induce la apoptosis mediada por la activación de p53 (Moley KH 2000). Además, se ha definido al sistema O-GlcNAc como un sensor nutricional, por su capacidad de adaptar a la célula a las condiciones nutricionales cambiantes del entorno. Los cambios en la concentración extracelular de glucosa, y otros nutrientes, modulan la función de algunas proteínas mediante la alteración de la O-GlcNAcilación (Zachara NE 2004 c; Butkinaree C 2010). De hecho, en condiciones de elevada concentración de nutrientes, el incremento de la O-GlcNAcilación actúa como retroalimentador negativo y promueve, por un lado la activación de las rutas de señalización que disminuyen la importación de glucosa, como la ruta de mTor (McDaniel ML 2002); y por otro, atenúa las rutas que estimulan el transporte de glucosa como PI3-K/AKT/PKB (Whiteman EL 2002). Por lo tanto, se ha sugerido que el incremento de la O-GlcNAcilación, observado en la respuesta al estrés celular, podría deberse al aumento del flujo de glucosa, descrito en este tipo situaciones (Revisado en (Zachara NE 2004 a)).

Por el contrario, el incremento crónico de la O-GlcNAcilación proteica, se ha vinculado con los efectos perjudiciales de enfermedades degenerativas, entre las que se encuentran la diabetes y la disfunción cardiovascular (Lunde IG 2012). Una de las características de la diabetes, es la resistencia a insulina, que provoca una hiperglicemia al impedir la captación de glucosa por parte de las células. La hiperglicemia y el tratamiento con glucosamina, inducen resistencia a insulina, en células y en modelos animales. En 1991, Marshall S. y colaboradores demostraron, que el aumento del flujo de la ruta HBP, mediante la administración de glucosamina, inducía resistencia a insulina en adipocitos (Marshall S 1991). Estudios posteriores, in vitro e in vivo, demostraron que el aumento de UDP-GlcNAc inducido por el incremento en el flujo de la ruta HBP, disparaba la O-GlcNAcilación y esto provocaba resistencia a insulina (Buse MG 2002; McClain DA 2002; Vosseller K 2002). Además, se han identificado proteínas O-GlcNaciladas que

forman parte de la ruta de señalización de la insulina y son varios los estudios que sugieren, que dicha modificación podría regular negativamente la ruta en diferentes pasos (Revisado en (Zachara NE 2004 a)). Por ejemplo, en el caso de las proteínas IRS1 y 2, cuya fosforilación activa la ruta de la insulina justo detrás del receptor, se ha observado que un incremento de la glucosamina extracelular, disminuye la fosforilación de dichas enzimas y se ha sugerido, que la O-GlcNAcilación de las mismas podría impedir su activación (Patti ME 1999). Por otra parte, el aumento de la O-GlcNAcilación inducido por la inhibición de OGA, no tiene consecuencias sobre la actividad de IRS1 y 2, pero sí disminuye la actividad de otras quinasas, como AKT/PKB, que se O-GlcNAcilan (Boehmelt G 2000; Vosseller K 2002). Todos estos estudios, y otros muchos, analizados en conjunto, apoyan la hipótesis de que los cambios en el nivel de O-GlcNAcilación global y específica de algunas proteínas, están claramente relacionados con la resistencia a insulina característica de la diabetes y con algunas de sus consecuencias. Por ejemplo, la hiperglicemia se ha asociado al desarrollo de neuropatías, retinopatías y nefropatías, en las que la O-GlcNAcilación podría contribuir a su evolución (Brownlee M 2001; Nakamura M 2001; Akimoto Y 2003). La cardiomiopatía diabética, también se ha relacionado con el incremento de la O-GlcNAcilación (Clark RJ 2003). Se ha observado una disminución en la síntesis y expresión de la proteína Ca-ATPasa 2A, implicada en el transporte del calcio, en los cardiomiocitos de rata sometidos a hiperglicemia. Este mismo resultado se observó al sobreexpresar OGT y curiosamente, la sobreexpresión de OGA corrigió en parte los efectos de la hiperglicemia (Hu Y 2005). Recientemente, se ha asociado el incremento de la O-GlcNAcilación en la cardiopatía diabética, con el fallo de la cadena respiratoria de las mitocondrias, que da lugar a un descenso en la producción de ATP. Se han detectado proteínas O-GlcNAciladas en los complejos respiratorios mitocondriales II, III y IV, cuya actividad se ve reducida en condiciones de hiperglicemia (Hu Y 2009). Los datos recogidos en la literatura sugieren, que el aumento crónico de la O-GlcNAcilación observado en la diabetes, parece estar asociado con los efectos tóxicos de la acumulación de glucosa o a un defecto en la gestión de nutrientes y energía.

Los datos en los seres humanos son muy escasos. Se ha publicado recientemente y por primera vez, que las proteínas O-GlcNAciladas se acumulan en los riñones de los pacientes con nefropatía diabética (Degrell P 2009). En 2002, Federici y colaboradores observaron un incremento de O-GlcNAcilación en las placas ateroscleróticas de pacientes con diabetes (Federici M 2002). Se ha estudiado la O-GlcNAcilación en eritrocitos de individuos diabéticos y pre-diabéticos, en los que se ha observado en ambos casos, un incremento de la O-GlcNAcilación y de la expresión y síntesis de OGA, pero no de OGT. Los autores sugieren, que

las enzimas podrían estar actuando de esta manera, en un intento por corregir el exceso de O-GlcNAcificación y estabilizar a los eritrocitos (Park K 2010). Los resultados de este trabajo, ponen de manifiesto la posibilidad en un futuro, de diagnosticar la diabetes de manera precoz, analizando el sistema de O-GlcNAcificación. Ahora sabemos, que en el cartílago artrósico también se acumulan proteínas O-GlcNAcificadas y quizá estemos ante un futuro marcador biológico, que ayude a diagnosticar la artrosis en las etapas más tempranas.

Uno de los factores de riesgo más importante en la artrosis, es la diabetes. Existen evidencias radiográficas, que demuestran mayor prevalencia de artrosis en individuos diabéticos que en los individuos no diabéticos (Waine H 1961). De hecho, se ha sugerido recientemente que la diabetes *per se*, independientemente de otros factores como la edad, es perjudicial y ocasiona las alteraciones articulares características de la artrosis (Schett G 2013). Se ha demostrado que los niveles elevados de glucosa en sangre, incrementan la producción de ROS en los condrocitos. Los AGES, resultantes de la hiperglicemia, estimulan en los condrocitos la expresión de proteínas pro-inflamatorias y degenerativas. Además, la diabetes está relacionada con la polineuropatía, que debilita los músculos y afecta a la articulación, incrementando el estrés mecánico que soporta (Revisado en (Schett G 2013)).

La artrosis, se ha asociado a una regulación defectuosa del metabolismo de la glucosa en los condrocitos. El transporte adecuado de glucosa, y otros nutrientes, es esencial en los condrocitos para llevar a cabo la síntesis de colágeno, proteoglicanos y glicosaminoglicanos. Los condrocitos artrósicos, no regulan correctamente la entrada de glucosa en la célula, porque son incapaces de adaptar la síntesis de los receptores GLUT/SLC2A, en respuesta a las concentraciones extracelulares cambiantes de esta molécula (Revisado en (Mobasheri A 2012)). Además, se ha demostrado que la enzima pro-inflamatoria IL-1 β , presente en las articulaciones artrósicas, estimula la absorción de glucosa en los condrocitos (Hernvann A 1996). Teniendo en cuenta estos datos sugerimos, que en condiciones de hiperglicemia, por ejemplo en el caso de pacientes diabéticos con artrosis, la glucosa podría entrar en el condrocito artrósico de forma descontrolada y alimentar el flujo de la ruta HBP, aumentando los niveles de O-GlcNAc celulares.

Por otro lado, se ha descrito en condrocitos artrósico una reducción de la actividad de los complejos mitocondriales II y III (Maneiro E 2003). Curiosamente, al menos en los cardiomiocitos de rata, las proteínas de estos complejos se O-GlcNAcilan y esta modificación parece estar asociada con la reducción de la actividad mitocondrial y de la producción de ATP (Hu Y 2009). La alteración en el proceso de producción de energía en las mitocondrias de los condrocitos, se traduce en una mala regulación del equilibrio redox intracelular (Martin JA

2012). El incremento de la O-GlcNAcilación proteica observado en los pacientes artrósicos, podría ser el responsable de los defectos en la gestión de la energía, observados en las mitocondrias de los condrocitos artrósicos.

I.A Estudio de la O-GlcNAcilación y su relación con la hipertrofia condrocitaria.

El incremento crónico de la O-GlcNAcilación proteica, también se ha asociado con la hipertrofia de células renales y cardíacas (Masson E 2006; Facundo HT 2012). Se ha demostrado, que un incremento en los niveles de O-GlcNAc celular, inducido por hiperglicemia o por glucosamina, provoca la hipertrofia en los cardiomiocitos de ratas neonatas, mediante la atenuación de la angiotensina II y el incremento del Ca^{2+} citosólico (Hunton DL 2002; Pang Y 2002; Nagy T 2006). Además, en modelos de fallo cardíaco, se ha relacionado la hipertrofia con un incremento de la O-GlcNAcilación proteica (Watson LJ 2010; Lunde IG 2012). Los pacientes que presentan una hipertrofia cardíaca, como consecuencia de un daño en el corazón, presentan un aumento en la O-GlcNAcilación, debido a una alteración de las enzimas OGT y OGA (Lunde IG 2012). Recientemente, Facundo y sus colaboradores describieron que la reactivación del programa genético fetal, durante la hipertrofia de los cardiomiocitos, coincidía con un aumento de la O-GlcNAcilación (Facundo HT 2012). Curiosamente, cuando la hipertrofia es fisiológica y ocurre como consecuencia de un ejercicio físico intenso, el nivel de O-GlcNAc disminuye significativamente. Los autores de este trabajo, sugieren que este descenso se debe a dos factores: una disminución en la expresión de la enzima GFAT probablemente inducida por el descenso de la glucosa en sangre gracias al ejercicio y un descenso en la expresión de OGT y OGA, que podrían actuar en tándem (Belke DD 2011). Estos datos sugieren, que las rutas que controlan la O-GlcNAcilación proteica, no se regulan de la misma manera en la hipertrofia patológica que en la fisiológica.

La hipertrofia es un fenotipo característico de los condrocitos artrósicos y se asocia también, con la reaparición de un patrón genético y proteico similar al observado durante el desarrollo embrionario, que codifica la síntesis de factores que destruyen, mineralizan y vascularizan el cartílago (van der Kraan PM 2012). Además, sabemos por la literatura, que entre las cientos de proteínas que se O-GlcNAcilan, algunas de ellas están funcionalmente relacionadas con la diferenciación endocondral y la hipertrofia celular. Se trata de proteínas implicadas en la vía Wnt, como la placoglobina (Hatsell S. 2003) o la β -catenina (Sayat R 2008), además de las quinasas dependientes de calcio/calmodulina (Dias W. B 2009) y de PI-3K/Akt (Gandy J.C. 2006). Recientemente hemos demostrado, que la acumulación de proteínas O-GlcNAciladas *per se*, es

capaz de inducir la hipertrofia condrocitaria tanto *in vivo* como *in vitro* (Andrés-Bergós J 2012). Utilizamos una línea celular condrogénica (ATDC5), que se diferencia al ser estimulada con insulina (Phornphutkul C. 2006) a través de la absorción de glucosa (Wang J. 1999). Describimos por primera vez, que la diferenciación de estas células tenía lugar después de un incremento en los niveles de O-GlcNAc, acompañado por un aumento de la presencia de OGT y OGA. Además, utilizamos un inhibidor de OGA, el thiamet-G, para incrementar el nivel de proteínas O-GlcNAcadas y observamos un aumento en la expresión de varios marcadores de diferenciación (Andrés-Bergós J 2012). En línea con nuestros resultados, se ha descrito también, la diferenciación de pre-adipocitos inducida por una acumulación de proteínas O-GlcNAcadas (Ishihara K. 2010) y a la inversa, se ha bloqueado la diferenciación de estas células, inhibiendo la ruta HBP (Hsieh T. J. 2012). Confirmamos la inducción de la hipertrofia condrocitaria, mediante el incremento de la O-GlcNAcación proteica, utilizando un modelo experimental en ratón. Administramos thiamet-G a ratones recién nacidos y observamos un aumento significativo de la placa de crecimiento, probablemente debido a un engrosamiento de la zona hipertrófica (Andrés-Bergós J 2012). En esta tesis, hemos observado un incremento de la síntesis de dos marcadores de hipertrofia, el colágeno tipo X y la MMP-13, en el cartílago de los pacientes artrósicos que presentaban una acumulación de proteínas O-GlcNAcadas. En base a los resultados publicados por nuestro grupo, sugerimos que el incremento de O-GlcNAc, podría estar directamente implicado en la hipertrofia observada en el cartílago de los pacientes artrósicos.

I.B Estudio de las enzimas OGT y OGA en la artrosis humana.

La O-GlcNAcación de proteínas está regulada por varios factores. Entre ellos, la expresión y la actividad de OGT y OGA, y la afinidad de estas enzimas por las proteínas diana, juegan un papel fundamental, por tratarse de las enzimas limitantes del sistema (Revisado en (Groves JA 2013)). El aumento de la O-GlcNAcación observado en el cartílago artrósico, se asoció con un aumento neto de la síntesis de OGT. Sin embargo, solo se observó un incremento estadísticamente significativo de la isoforma OGT_s, en comparación con el grupo control. De hecho, las isoformas OGT_{nc} y OGT_m, están inhibidas en el cartílago artrósico con respecto a los donantes. Curiosamente, en el cartílago sano no se aprecian diferencias en las isoformas. Estos datos nos sugieren una redistribución de las isoformas de OGT en el cartílago artrósico.

En los condrocitos aislados a partir del cartílago artrósico, la presencia de OGT también aumenta netamente en comparación con los condrocitos sanos. Sin embargo, además de

incrementar la síntesis de OGT_s, también aumenta la síntesis de la isoforma OGT_m. Curiosamente, la isoforma OGT_{nc}, no varía en los condrocitos artrósicos con respecto a los sanos, a pesar de ser la isoforma más abundante.

Hemos detectado una diferencia en la presencia de OGT, entre el cartílago total y los condrocitos aislados. Al parecer, OGT_s es la isoforma mayoritaria en el cartílago total artrósico. Sin embargo, en los condrocitos aislados artrósicos, OGT_s está incrementada con respecto a los sanos, pero no es la isoforma con más presencia. Los estudios en el cartílago total, incluyen proteínas celulares y de la matriz extracelular. Es posible, que la presencia mayoritaria de la OGT_s observada en el cartílago, en comparación con los condrocitos aislados, se deba a que esta isoforma se localice en la MEC.

En cualquier caso, tanto en el cartílago como en los condrocitos aislados, la síntesis de OGT aumenta netamente. Sabemos por la literatura, que el incremento de la O-GlcNAcilación celular, se debe en parte al aumento de la presencia de OGT, en respuesta al estrés agudo y al daño crónico (Zachara NE 2012; Lunde IG 2012). También hemos observado en el cartílago artrósico, un aumento neto de la síntesis de la enzima responsable de la eliminación de O-GlcNAc, OGA. Nuestros resultados coinciden con los datos recientemente publicados, sugiriendo que OGT y OGA pueden aumentar o disminuir en tándem, en respuesta a una modificación crónica de los niveles de O-GlcNAc (Belke DD 2011; Andrés-Bergós J 2012; Zachara NE 2012; Lunde IG 2012). Curiosamente, las células responden ante un daño agudo, incrementando los niveles de O-GlcNAc, mediante el aumento de OGT y la inhibición de OGA (Taylor and M. J. 2008). Sin embargo, la respuesta ante un daño crónico es diferente y la modulación de los niveles de O-GlcNAc, se debe a la actuación de las enzimas en el mismo sentido. Se ha demostrado, que la acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas en hipertrofia cardíaca y en hipertrofia condrocitaria, está asociada con un incremento de la síntesis de OGT y OGA (Andrés-Bergós J 2012; Lunde IG 2012). Se ha sugerido, que la actuación en tándem de OGT y OGA, tiene por objeto controlar la señalización celular mediada por la O-GlcNAcilación de proteínas, más que como un intento por mantener los niveles de O-GlcNAc (Watson LJ 2010). Hasta ahora, la regulación en tándem de las enzimas OGT y OGA, se había descrito en estudios crónicos cuyos resultados presentaban una disminución del nivel de O-GlcNAc, relacionado con una disminución de la síntesis de ambas enzimas (Belke DD 2011). Además, se ha demostrado *in vitro*, en células nulas para OGT manipuladas genéticamente, que la expresión de OGA disminuye significativamente, en respuesta a la manipulación (Kazemi Z 2010). Es la primera vez que se describe una actuación en tándem de las enzimas OGT y OGA, asociada a un incremento de O-GlcNAc, en una patología crónica articular.

Por otro lado, si analizamos de cada isoforma de OGA, a pesar de que aumentan netamente, la isoforma OGA_L se inhibe mientras que la OGA_S está inducida en el cartílago artrósico. Atendiendo a los resultados publicados por Lefebvre T. y colaboradores en 2010, sabemos que la isoforma OGA_S, tiene actividad acetiltransferasa de histonas, pero no se ha descrito para esta isoforma actividad O-GlcNAcase, como ocurre con OGA_L (Lefebvre T 2010). Por lo tanto, la inhibición de OGA_L junto con el incremento neto de OGT, podría ser la causa de la acumulación de proteínas O-GlcNAcadas observadas en el cartílago de los pacientes.

I.C Estudio de localización de OGT en el cartílago humano.

El proceso de O-GlcNAcación de proteínas, se ha ubicado dentro de las células en el compartimento nuclear, citoplásmico y mitocondrial. En la literatura, está descrita la presencia de OGT en estos compartimentos subcelulares. En cuanto a OGA, no se conoce con exactitud la localización de la enzima. Probablemente, la ausencia de datos referentes a la localización subcelular de OGA, se deba a la inexistencia de anticuerpos comerciales específicos para esta enzima. El anticuerpo que utilizamos para analizar la síntesis de OGA, fue sintetizado y donado por el laboratorio de la Dra. Natasha Zachara, de la Universidad Johns Hopkins de Baltimore (USA). Sin embargo, este anticuerpo no es eficaz en los ensayos de inmunohistoquímica, motivo por el cual, los resultados que presentamos sólo recogen la localización de OGT.

Hemos detectado mediante inmunohistoquímica, una señal extracelular de OGT en el cartílago articular de pacientes y de donantes sanos. La presencia de OGT, parece ser más intensa en los pacientes y además se localiza puntualmente en torno a los clones de condrocitos. En el cartílago sano, la señal de OGT es más difusa y se distribuye uniformemente por todo el tejido. Este resultado pone de manifiesto la presencia de OGT dentro de la célula así como en la matriz extracelular. En el cartílago articular artrósico observamos una redistribución de las isoformas de OGT, que además no era igual que la redistribución observada en los condrocitos artrósicos. Mientras que en el cartílago artrósico la isoforma mayoritaria era OGT_S, en los condrocitos aislados artrósicos, OGT_S aumentaba pero no era la mayoritaria. La señal extracelular de OGT observada en el cartílago, podría explicar estas diferencias entre el cartílago total y los condrocitos aislados. Los datos sugieren que la isoforma OGT_S podría actuar en la MEC y por ese motivo no se presenta como la mayoritaria en los condrocitos aislados. No hay evidencias bibliográficas que demuestren la localización de OGT extracelular. Sin embargo, se ha publicado un artículo recientemente en el que detectan una isoforma de OGT en un espacio subcelular nunca antes descrito: el retículo endoplásmico (Sakaidani Y

2011). Dicha isoforma, a la que han llamado EOGT (por *endoplasmic reticulum*-OGT), actúa en este espacio subcelular y cataliza la reacción de O-GlcNAcilación de los dominios extracelulares de algunas glicoproteínas de membrana y de proteínas que se secretan al espacio extracelular. Estos resultados plantean la posibilidad de nuevos lugares de actuación del sistema O-GlcNAc.

I.D Estudio de la regulación del sistema O-GlcNAc en condrocitos artrósicos humanos estimulados con IL-1 α .

Los estudios *in vitro* realizados en condrocitos artrósicos humanos, sugieren que la citoquina IL-1 α , abundante en los tejidos artrósicos, es capaz de estimular el sistema O-GlcNAc. Observamos una acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas que se asoció con un aumento neto de la síntesis de OGT y OGA, en los condrocitos estimulados con respecto al basal. Estos resultados, coinciden con lo que observamos en el cartílago articular artrósico. Hemos observado una respuesta relativamente rápida, ya que a las tres horas detectamos una acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas. En los ensayos de seis horas de estimulación, la O-GlcNAcilación proteica alcanza los valores más altos y a partir de las 24 horas la acumulación sigue estando aumentada, con respecto al basal. Observamos un incremento neto de la síntesis de las enzimas del sistema, también a tiempos cortos, que sugieren la actuación en tándem descrita anteriormente. Sin embargo, en los experimentos de 24 horas de estimulación con IL-1 α , observamos inhibición neta de OGA, con respecto al basal. OGT a las 24 horas de estimulación, está significativamente aumentada con respecto al basal. Estos resultados, coinciden con los datos publicados con respecto a la actuación de las enzimas frente a un daño agudo (Taylor and M. J. 2008) y sugieren que la acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas observada tras 24 horas de estimulación con IL- α , podría estar inducida por un incremento de OGT y una inhibición de OGA.

Anteriormente hemos comentado, que los condrocitos artrósicos no son capaces de adaptarse a los niveles cambiantes de glucosa extracelular y además, se ha demostrado que la estimulación con citoquinas pro-inflamatorias induce la absorción de glucosa en los condrocitos en cultivo. Es posible, que la citoquina IL-1 α estimule la entrada de glucosa en las células, alimentando así el flujo de la ruta HBP y por lo tanto module el sistema de O-GlcNAcilación *in vitro*.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas observada en la artrosis, podría deberse a un incremento en la presencia de OGT y OGA, que quizá esté relacionada con el metabolismo defectuoso de la glucosa en la artrosis.

Nuestros datos establecen un enlace entre la fisiopatología artrósica y las alteraciones en las rutas dependientes de glucosa y apoyan la hipótesis de que las modificaciones en los niveles de O-GlcNAc, pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de enfermedades crónicas y relacionadas con la edad.

II. ESTUDIO DE LA O- β -NACETILGLICOSILACIÓN EN LA ARTROSIS EXPERIMENTAL.

El estudio del sistema O-GlcNAc en enfermedades crónicas está cada vez más extendido. Sin embargo, la mayoría de los trabajos recogen datos de una acumulación de proteínas O-GlcNAc en las fases más degenerativas y avanzadas de las enfermedades en estudio. Son pocos los autores que describen alteraciones en el sistema en etapas intermedias. Park y colaboradores describieron una alteración del sistema de O-GlcNAc en los eritrocitos de individuos pre-diabéticos y diabéticos (Park K 2010) y Fülöp y colaboradores observaron un incremento progresivo del nivel de O-GlcNAc en ratas sanas, asociado a la edad (Fülöp N 2008). Nosotros hemos analizado en un modelo experimental de artrosis inducida en conejo, la alteración del sistema O-GlcNAc en el hueso subcondral y en el cartílago, de conejos sacrificados a diferentes tiempos de desarrollo de la artrosis. Se trata de un estudio preliminar, en el que sólo se incluyeron cinco conejos por grupo, con el fin de analizar las posibles diferencias en el sistema O-GlcNAc y determinar en qué momento era más adecuado llevar a cabo el estudio. Observamos, a medida que evolucionaba el daño en la articulación, que las proteínas O-GlcNAc tendían a acumularse hasta alcanzar el máximo a las 12 semanas de desarrollo del modelo. Los resultados de esta acumulación, medidos en cartílago y hueso subcondral, en ningún caso fueron significativos estadísticamente, debido al tamaño del grupo. Sin embargo, sí observamos diferencias significativas en la síntesis de las enzimas OGT y OGA, que variaban con el avance de la enfermedad, en ambos tejidos. Puesto que los cambios más significativos ocurren en el cartílago a las 12 semanas de evolución del modelo experimental, enfocamos el estudio en esta etapa y en este tejido, con el objetivo de entender mejor el mecanismo que relaciona la artrosis con la O-GlcNAc de proteínas.

II. A Estudio histopatológico y molecular de la articulación artrósica en el modelo experimental.

La artrosis es una enfermedad de órgano que se caracteriza por la degeneración y la deformación estructural de todos los tejidos de la articulación. Los cambios estructurales y moleculares afectan a toda la estructura de la articulación y provocan dolor, deformación y

pérdida de la función articular. Estos cambios pueden medirse en los tejidos de la articulación. Nosotros hemos evaluado el daño estructural y molecular, del modelo experimental de artrosis inducida quirúrgicamente en los conejos de 12 semanas de evolución. Hemos utilizado la escala de Mankin para analizar el daño estructural macroscópico en el cartílago y hemos valorado tres marcadores catabólicos y tres pro-inflamatorios, para determinar el daño a nivel molecular asociado a la enfermedad. La síntesis de los marcadores biológicos más relevantes, está incrementada en los conejos con artrosis y el Mankin confirma estructuralmente estos resultados. Los conejos artrósicos manifiestan un daño estructural y un nivel de inflamación mayor que los conejos sanos. Además, la disminución del ratio OPG/RANKL y el incremento de la síntesis de MMP-3 y -13, describen un aumento del remodelado óseo y del programa catabólico que resulta en la destrucción del cartílago. Estos resultados, ponen de manifiesto que la artrosis inducida quirúrgicamente en los conejos, presenta estructural y molecularmente características similares a la artrosis descrita en humanos.

II.B Estudio del efecto del sulfato de glucosamina (SG) sobre la modulación del sistema O-GlcNAc, en el cartílago de los conejos artrósicos.

La glucosamina es un amino-monosacárido que actúa como precursor estructural de la síntesis de glucosaminoglucanos y de los agregados de los proteoglicanos. Todas las células sintetizan glucosamina a partir de glucosa, a través de la ruta de las hexosaminas (HBP). La glucosamina exógena deriva de la quitina, un biopolímero presente en el exoesqueleto de los animales invertebrados marinos y entra en las células a través de los receptores de glucosa (GLUT/SLC2A), directamente a la ruta HBP, por debajo de la enzima GFAT. Una vez dentro de la célula es transformada directamente en glucosamina-6-P, que continúa metabolizándose hasta obtener el producto final de la ruta HBP, el UDP-GlcNAc (Marshall S 1991; H. Chen 1997; Yki-Järvinen H 1998). La industria farmacéutica, sintetiza sulfato de glucosamina (SG), hidrocloreto de glucosamina y N-acetil-glucosamina, que se administran como fármacos para tratar la artrosis humana. El tratamiento en humanos se recomienda vía oral, a pesar de no tener transporte activo intestinal, a una dosis de 1500 mg por día (Simánek V 2005).

El SG ha suscitado cierta controversia en cuanto a su eficacia para frenar el avance de la artrosis y paliar el dolor en pacientes. Algunos autores apoyan su utilización en los casos de artrosis de leve a moderada, pero nunca ante un caso de artrosis severa (Revisado en (Burdett N 2012; Sherman AL 2012)). Los ensayos clínicos en humanos, no han tenido los resultados

esperados, al compararlos con la eficacia del fármaco en estudios *in vitro*. La actividad anabólica del SG demostrada *in vitro*, podría tener un efecto positivo sobre la reparación y el mantenimiento de la estructura del cartílago (Verbruggen G 2006). Existen datos, aunque muy escasos, sobre el posible papel preventivo del SG en la diferenciación condrocitaria (Nakatani S 2007). Además de su actividad condroprotectora, se le atribuyen efectos antiinflamatorios en las células articulares (Jang BC 2007). Sabemos por la literatura y por trabajos publicados por nuestro grupo, que el SG inhibe *in vitro*, el efecto catabólico de las citoquinas pro-inflamatorias presentes en el cartílago artrósico, como la IL-1 (Largo R 2003). Además, inhibe la activación y traslocación al núcleo del NF- κ B inducido por IL-1, en condrocitos artrósicos y en células sinoviales humanas (Gouze JN 2002). Esta inhibición resulta en una disminución de la síntesis de COX-2, de la liberación de PGE-2 y de la síntesis de metaloproteasas en ambos tipos celulares, y en condrocitos, en una disminución de la liberación de NO (Alvarez-Soria MA 2006).

El SG es además, un conocido modulador de la O-GlcNAcilación, por su capacidad para alimentar el flujo de la ruta HBP y aumentar así la concentración del UDP-GlcNAc celular (Vosseller K 2002; Marshall S 2004). Se ha demostrado recientemente, que el SG incrementa los niveles de O-GlcNAc directamente, a través de la ruta HBP (Zou L 2007). Puesto que el incremento de O-GlcNAc en respuesta a un daño agudo, se ha considerado como un mecanismo de defensa celular (Revisado en (Groves JA 2013)), al SG se le ha adjudicado un papel protector por su capacidad de incrementar los niveles de O-GlcNAc en la célula (Yang S 2006; Zou L 2007; Zou L 2009; Xu L 2010). Por este motivo, se ha estudiado su papel en la respuesta frente al estrés celular. Se ha visto que el SG inhibe parcialmente la cascada pro-inflamatoria mediada por NF- κ B, a través del incremento del nivel de O-GlcNAc celular (Yang S 2006; Zou L 2007; Zou L 2009).

Los efectos beneficiosos del SG, como tratamiento contra la artrosis, demostrados *in vitro*, en otros modelos animales y en algunos ensayos clínicos con pacientes, así como su capacidad para modular la O-GlcNAcilación celular a través del flujo de la ruta HBP, son los motivos por los cuales hemos elegido el SG, con el fin de observar sus efectos sobre la O-GlcNAcilación en la artrosis experimental. Los conejos de este modelo han recibido SG vía oral, a una dosis de 1500 mg por día. Es la dosis recomendada para humanos, pero a pesar de ser una dosis aparentemente elevada, se ha demostrado que no aumenta la glucosa medida en sangre y no induce resistencia a insulina (Stumpf JL 2006; Largo R 2009). Los conejos recibieron una administración preventiva del fármaco. Empezaron a tomarlo dos semanas antes de la cirugía y continuaron tomándolo hasta el final del estudio. Decidimos administrar el fármaco de esta

manera, porque el objetivo era controlar la inflamación y estudiar ese efecto sobre la O-GlcNAcilación proteica.

En primer lugar, observamos un incremento de la O-GlcNAcilación proteica en el cartílago de los conejos artrósicos, que podría deberse a la alteración en la síntesis de OGT y OGA. Hemos reproducido en el modelo de artrosis experimental, la acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas observada en el cartílago de los pacientes artrósicos. Curiosamente, los conejos que recibieron SG acumularon menos proteínas O-GlcNAcizadas y además, no desarrollaron el daño estructural que se apreciaba en los conejos artrósicos. Hasta ahora, los trabajos publicados describían una acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas cuando se administraba SG. Se trataba de estudios que describían el efecto del SG administrado de manera puntual, después de un daño agudo. No se conoce la repercusión de un tratamiento con SG en una enfermedad crónica, en cuanto a su efecto sobre el sistema O-GlcNAc. Es la primera vez que se describe el efecto de la administración prolongada del SG sobre el sistema O-GlcNAc, en un proceso patológico crónico, y el resultado es una disminución significativa de los niveles de O-GlcNAc.

La presencia de OGT y OGA, estaba alterada en el cartílago de los conejos artrósicos, con respecto al grupo control. Detectamos en conejos, las tres isoformas de OGT descritas en humanos: OGT_{nc}, OGT_m y OGT_s. Observamos también cierta redistribución, aunque en el cartílago de los conejos artrósicos, las tres isoformas se inducen y la mayoritaria parece ser la OGT_{nc}, en comparación con el grupo de conejos sanos. En el caso de OGA, detectamos la isoforma OGA_L y observamos una inhibición significativa de la síntesis, con respecto al grupo control. En este caso, no parece que las enzimas estén actuando en tándem, como ocurría en el cartílago artrósico de los pacientes. Los datos sugieren que la acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas observada en el cartílago de los conejos artrósicos, se debe al incremento de OGT y la inhibición de OGA, como se describe en otros trabajos que han sido anteriormente discutidos (Taylor and M. J. 2008). En cualquier caso, el SG no fue capaz de modificar la síntesis de las enzimas. OGT y OGA, mostraban la misma alteración, que en el cartílago de los conejos artrósicos. La realidad es, que el SG recuperó en parte el daño estructural del cartílago artrósico y además los conejos que recibieron esta molécula, acumularon menos proteínas O-GlcNAcizadas. Las enzimas OGT y OGA, no parecen estar implicadas en la disminución de la O-GlcNAcilación, sin embargo sugerimos un estudio de la expresión y actividad enzimática del sistema. Puede ser, que a pesar de que la síntesis de OGT y OGA no se vea regulada por el SG, quizá la actividad enzimática sí está alterada.

Hemos comentado anteriormente, la posibilidad de que las rutas que modulan la O-GlcNAcilación en la hipertrofia cardiaca, podrían no ser reguladas de la misma forma en la hipertrofia fisiológica que en la patológica, ya que en el primer caso la O-GlcNAc disminuye y en el segundo, aumenta (Belke DD 2011). Además, sabemos que en los modelos de resistencia a insulina, el incremento de O-GlcNAc modifica diferencialmente las enzimas de la ruta de la insulina, en función de si la causa del incremento es la glucosamina extracelular o la inhibición de OGA (Revisado en (Zachara NE 2004 a)). En base a estas publicaciones y a los resultados obtenidos, nos planteamos la posibilidad de que el SG podría estar interviniendo en la disminución de O-GlcNAc a través de otros mecanismos celulares. El SG es capaz de disminuir la respuesta inflamatoria a través de la modulación de la O-GlcNAcilación de determinadas proteínas (Yang S 2006; Zou L 2007; Zou L 2009). Además, el SG es capaz de reducir la síntesis *in vitro*, de determinados factores pro-inflamatorios en la artrosis (Largo R 2003; Largo R 2009). Nos planteamos la posibilidad de que este fármaco, estuviera actuando sobre el sistema O-GlcNAc en el cartílago artrósico de los conejos, a través de la modificación del componente inflamatorio. Analizamos la síntesis de COX-2 y observamos por primera vez, una disminución significativa en los conejos que habían consumido SG y que presentaban una menor acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas, en comparación con los conejos no tratados.

III. ESTUDIO DEL EFECTO DEL SULFATO DE GLUCOSAMINA (SG) SOBRE LA ACTIVIDAD DEL NF- κ B A TRAVÉS DE LA O-GLCNACILACIÓN DE P65, EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE OA EN CONEJO.

Hemos detectado alteraciones en la estructura del cartílago, un incremento de la presencia de COX-2 y la activación del sistema O-GlcNAc, en el cartílago de los conejos artrósicos, que se corregían en los conejos que habían recibido SG, y cuyos valores se acercaban a los del grupo control. Sabemos, que uno de los moduladores más importantes de los factores catabólicos y pro-inflamatorios en la artrosis, es el factor de transcripción nuclear – κ B (NF- κ B). Observamos, que la actividad del NF- κ B aumentaba en el cartílago de los conejos artrósicos y se inhibía parcialmente en los conejos tratados con SG. Además, la síntesis del heterodímero p50-p65, medida en el citoplasma y en el núcleo de los condrocitos aislados del cartílago de los conejos, estaba inducida en los conejos artrósicos e inhibida en los conejos tratados con SG. Sabemos por la literatura, que la subunidad p65 del NF- κ B, es susceptible de O-GlcNAcilarse y esta modificación regula su actividad en el núcleo (James LR 2002; Golks A 2007; Yang WH 2008). Hemos observado, que la presencia de p50-p65 O-GlcNAcizado, es mayor en el citoplasma de los condrocitos de conejos artrósicos que en los sanos. En el caso de los conejos

tratados con SG, el 50-p65 que se detecta en el citoplasma, está O-GlcNAcilo. La literatura sugiere que la O-GlcNAcilo del NF- κ B regula su traslocación al núcleo, mediante la interrupción de la unión a I κ B (James LR 2002; Golks A 2007; Yang WH 2008). Es posible, que la GlcNAcilo de p50-p65 medida en el citoplasma, esté relacionada con el incremento de O-GlcNAc que observamos en los conejos artrósicos.

En el núcleo de los condrocitos, observamos que la O-GlcNAcilo de p50-p65 disminuye en los conejos artrósicos con respecto a los sanos. Por el contrario, los conejos que han recibido SG, presentan una O-GlcNAcilo de p50-p65 con valores más elevados que los artrósicos y que los sanos. Sabemos que la actividad del NF- κ B depende de la relación entre el proceso de fosforilación y O-GlcNAcilo, tal y como se describe en el artículo publicado recientemente por Xing D. y colaboradores (Xing D 2011). Además, la fosforilación de diferentes residuos de p65, tienen efectos directos sobre la actividad del NF- κ B. De hecho, la fosforilación de la treonina 254 (Thr-254) estabiliza la proteína p65 (Ryo A 2003), la fosforilación de la serina 276 (Ser-276) regula la unión al DNA (Zhong H 1997) y la fosforilación de la Ser-536 disminuye la afinidad por el I κ B α (Bohuslav J 2004). Se ha demostrado, que el tratamiento con SG, permite la O-GlcNAc de algún residuo de p65 que provoca la inhibición de la fosforilación de la Ser-536, permitiendo que se mantenga la unión del I κ B α al dímero y disminuyendo así la respuesta inflamatoria del NF- κ B (Xing D 2011). Es posible, que la O-GlcNAcilo en otros residuos de p65 module de diferente manera la actividad del NF- κ B. Por otro lado, se ha publicado recientemente un trabajo, en el que demuestran que el factor de transcripción Sp1, relacionado con la ruta de la insulina, cuando se O-GlcNAcila inducido por la sobre-expresión de OGT, inhibe su actividad de transcripción. Aunque no está del todo claro, es posible que esta inhibición se deba a un defecto en la unión de Sp1 al DNA (Jochmann R 2009). A pesar de que los resultados obtenidos son preliminares y considerando la necesidad de un estudio más profundo, sugerimos que la O-GlcNAcilo de p65 en el núcleo, podría impedir su unión al DNA, atenuando así la respuesta inflamatoria del NF- κ B, en la artrosis.

Los resultados obtenidos en esta tesis, sugieren un papel importante del sistema O-GlcNAc en la artrosis humana y experimental. La acumulación de proteínas O-GlcNAcilas, así como la alteración en la síntesis de las enzimas OGT y OGA, podrían considerarse un marcador biológico de la enfermedad. Además, la regulación del sistema, mediada por el SG a través de la atenuación de la respuesta inflamatoria estimulada por NF- κ B, abre las puertas a la investigación futura, sobre posibles dianas terapéuticas para la artrosis.

VI. CONCLUSIONES

1. En el cartílago articular de los pacientes artrósicos, se acumulan proteínas O-GlcNAcizadas debido, al menos en parte, al aumento neto de la presencia de las enzimas OGT y OGA. La acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas en el cartílago artrósico humano, se produce de forma simultánea a un incremento en la presencia de marcadores de hipertrofia condrocitaria, como sugiere el aumento de la síntesis de colágeno tipo X y MMP-13.
2. En el cartílago artrósico humano observamos también una redistribución de las isoformas de OGT en el cartílago artrósico humano, que aumentaba de forma neta, así como un incremento neto en la presencia de OGA. Estos resultados sugieren una actuación en tándem de las enzimas, que tiene como resultado la acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas en el cartílago artrósico humano.
3. Los estudios *in vitro* realizados en condrocitos artrósicos humanos, indican que la citoquina IL-1 α , abundante en la articulación artrósica humana, podría estimular el sistema O-GlcNAc e inducir la acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas, incrementando la síntesis de OGT y OGA.
4. Nuestros resultados demuestran, que la artrosis humana podría asociarse con una regulación defectuosa del sistema O-GlcNAc, que da lugar a la acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas inducida por un aumento en la síntesis de OGT y OGA. Nuestros datos establecen un enlace entre la fisiopatología artrósica y las alteraciones en las rutas dependientes de glucosa. Estos datos apoyan la hipótesis de que las modificaciones en los niveles de O-GlcNAc, pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de enfermedades crónicas y asociadas con el envejecimiento.
5. En el modelo experimental de artrosis inducida en conejo, hemos observado lesiones histopatológicas similares a las lesiones que presenta el cartílago humano artrósico. Además, observamos que también se reproduce en este modelo un incremento en la presencia de diferentes mediadores proinflamatorios y catabólicos, como COX-2, IL-1 β , iNOS, MMPs o del ratio OPG/RANKL. En estos animales, observamos que existe un acúmulo de proteínas O-GlcNAcizadas en el cartílago articular artrósico, en comparación con el cartílago de conejos sanos. Además, la artrosis indujo un incremento en la síntesis de OGT y una inhibición de OGA.

6. La administración de SG, un inductor de la ruta de las hexosaminas, fue capaz de disminuir el daño histopatológico en el cartílago de los conejos con artrosis, además de inducir una disminución en la síntesis de COX-2. Simultáneamente, la administración de SG redujo significativamente la presencia de proteínas O-GlcNAcizadas en el cartílago de los conejos con artrosis, en comparación con los animales no tratados. Sin embargo, hemos observado que el SG no modula la presencia de las enzimas reguladoras del sistema, OGT y OGA.

7. La administración de SG también indujo una disminución significativa en la actividad del factor de transcripción NF- κ B en el cartílago, en comparación con los conejos artrósicos no tratados, en los que observamos un incremento en la actividad de este mediador. Nuestros resultados sugieren que la administración de SG podría modular la actividad del NF- κ B a través de la O-GlcNAcización de la subunidad p65 en los condrocitos, aunque nuestros datos no son definitivos en este sentido.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abramson SB, Attur M (2009). "Developments in the scientific understanding of osteoarthritis." *Arthritis Res Ther* **11**(3): 227.
- Ahmed N (2005). "Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications." *Diabetes Res Clin Pract* **67**(1): 3-21.
- Akimoto Y, Kawakami H, Yamamoto K, Munetomo E, Hida T, Hirano H (2003). "Elevated expression of O-GlcNAc-modified proteins and O-GlcNAc transferase in corneas of diabetic Goto-Kakizaki rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(9): 3802-9.
- Alvarez-Soria MA, Largo R, Santillana J, Sánchez-Pernaute O, Calvo E, Hernández M, Egido J, Herrero-Beaumont G (2006). "Long term NSAID treatment inhibits COX-2 synthesis in the knee synovial membrane of patients with osteoarthritis: differential proinflammatory cytokine profile between celecoxib and aceclofenac." *Ann Rheum Dis* **65**(8): 998-1005.
- Andrés-Bergós J, Tardío L, Larranaga-Vera A, Gómez R, Herrero-Beaumont G, Largo R (2012). "The increase in O-linked N-acetylglucosamine protein modification stimulates chondrogenic differentiation both in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **287**(40): 33615-28.
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N (1999). "On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database." *Biochim Biophys Acta* **1473**(2): 4-8.
- Arden N, Nevitt MC (2006). "Osteoarthritis: epidemiology." *Best Pract Res Clin Rheumatol* **20**(1): 3-25.
- Bassleer C, Rovati L, Franchimont P (1998). "Stimulation of proteoglycan production by glucosamine sulfate in chondrocytes isolated from human osteoarthritic articular cartilage in vitro." *Osteoarthritis Cartilage* **6**(6): 427-34.
- Beas C, Ortuño D, Armendáriz J, McGraw-Hill (2009). "Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones".
- Belke DD (2011). "Swim-exercised mice show a decreased level of protein O-GlcNAcylation and expression of O-GlcNAc transferase in heart." *J Appl Physiol* **111**(1): 157-62.
- Bellido M, Lugo L, Roman-Blas JA, Castañeda S, Caeiro JR, Dapia S, Calvo E, Largo R, Herrero-Beaumont G (2010). "Subchondral bone microstructural damage by increased remodelling aggravates experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis." *Arthritis Res Ther* **12**(4): R152.
- Benito MJ, Sánchez-Pernaute O, López-Armada MJ, Hernández P, Palacios I, Egido J, Herrero-Beaumont G (2000). "Cyclosporin A prevents the histologic damage of antigen arthritis without inducing fibrosis." *Arthritis Rheum* **43**(2): 311-9.
- Berenbaum F (2011). "Diabetes-induced osteoarthritis: from a new paradigm to a new phenotype." *Ann Rheum Dis* **70**(8): 1354-6.
- Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP (2005). "Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products." *J Mol Med (Berl)* **83**(11): 876-86.
- Bimboese P, Gibson CJ, Schmidt S, Xiang W, Ehrlich BE (2011). "Isoform-specific regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by O-linked glycosylation." *J Biol Chem* **286**(18): 15688-15697.
- Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP (2010). "Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis." *Osteoarthritis Cartilage* **18**(1).
- Boehmelt G, Wakeham A, Elia A, Sasaki T, Plyte S, Potter J, Yang Y, Tsang E, Ruland J, Iscove NN, Dennis JW, Mak TW (2000). "Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells." *EMBO J* **19**(19): 5092-104.
- Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y, Greene WC (2004). "p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1." *J Biol Chem* **279**(25): 26115-25.

- Bond MR, Hanover JA (2013). "O-GlcNAc Cycling: A Link Between Metabolism and Chronic Disease." Annu Rev Nutr [Epub ahead of print].
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003). "Osteoclast differentiation and activation." Nature **423**(6937): 337-42.
- Brandt KD, Radin EL, Dieppe PA, van de Putte L (2006). "Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease." Ann Rheum Dis **65**(10): 1261-4.
- Brownlee M (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." Nature **414**(6865): 813-20.
- Brownlee M, Vlassara H, Cerami A (1984). "Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications." Ann Intern Med **101**(4): 527-37.
- Burdett N, McNeil JD (2012). "Difficulties with assessing the benefit of glucosamine sulphate as a treatment for osteoarthritis." Int J Evid Based Healthc **10**(3): 222-6.
- Buse MG (2006). "Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(1): E1-E8.
- Buse MG, Robinson KA, Marshall BA, Hresko RC, Mueckler MM (2002). "Enhanced O-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in GLUT1-overexpressing muscles." Am J Physiol Endocrinol Metab **283**(2): E241-50.
- Butkinaree C, Cheung WD, Park S, Park K, Barber M, Hart GW (2008). "Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis." J Biol Chem **29**(283(35)): 23557-66.
- Butkinaree C, Park K, Hart GW (2010). "O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress." Biochim Biophys Acta **1800**(2): 96-106.
- Caramés B, Taniguchi N, Otsuki S, Blanco FJ, Lotz M (2010). "Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis." Arthritis Rheum **62**(3): 791-801.
- Carapito C, Klemm C, Aebersold R, Domon B (2009). "Systematic LC-MS analysis of labile post-translational modifications in complex mixtures." J Proteome Res **8**(5): 2608-14.
- Castañeda S, Roman-Blas JA, Largo R, Herrero-Beaumont G (2013). "What is osteoarthritis today? A progressive disease of changing phenotypes." Rheumatology (Oxford): in press.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2010). "Prevalence of doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation --- United States, 2007-2009." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **59**(39): 1261-5.
- Clark AG, Rohrbach AL, Otterness I, Kraus VB (2002). "The effects of ascorbic acid on cartilage metabolism in guinea pig articular cartilage explants." Matrix Biol **21**(2): 175-84.
- Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, Trost SU, Suzuki M, Fukuda M, Dillmann WH (2003). "Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation." J Biol Chem **278**(45): 44230-7.
- Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, Bradley JD, Bingham CO 3rd, Weisman MH, Jackson CG, Lane NE, Cush JJ, Moreland LW, Schumacher HR Jr, Oddis CV, Wolfe F, Molitor JA, Yocum DE, Schnitzer TJ, Furst DE, Sawitzke AD, Shi H, Brandt KD, Moskowitz RW, Williams HJ (2006). "Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis." N Engl J Med **354**(8): 795-808.
- Comer FI, Hart GW (1999). "O-GlcNAc and the control of gene expression." Biochim Biophys Acta **1473**(1): 161-71.
- Comtesse N, Maldener E, Meese E (2001). "Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase." Biochem Biophys Res Commun **11**(283(3)): 634-40.
- Copeland RJ, Han G, Hart GW (2013). "O-GlcNAcomics - Revealing Roles of O-GlcNAcylation in Disease Mechanisms and Development of Potential Diagnostics." Proteomics Clin Appl [Epub ahead of print].

- Cruz-Sánchez FF, Gironès X, Ortega A, Alameda F, Lafuente JV (2010). "Oxidative stress in Alzheimer's disease hippocampus: a topographical study." J Neurol Sci **299**(1-2): 163-7.
- Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC (2007). "Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O-GlcNAc." Am J Physiol Cell Physiol **292**(1): C178-87.
- Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC (2008). "Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2." Am J Physiol Cell Physiol **294**: C1509 -C1520.
- Chan PS, Caron JP, Orth MW (2006). "Short-term gene expression changes in cartilage explants stimulated with interleukin beta plus glucosamine and chondroitin sulfate." J Rheumatol **33**(7): 1329-40.
- Chatham JC, Nöt LG, Fülöp N, Marchase RB (2008). "Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma." Shock **29**(4): 431-40.
- Cheng X, Hart GW (2000). "Glycosylation of the murine estrogen receptor-alpha." J Steroid Biochem Mol Biol **75**(2-3): 147-58.
- Cheng X, Hart GW (2001). "Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: posttranslational regulation of turnover and transactivation activity." J Biol Chem **276**(13): 10570-10575.
- Chou TY, Dang CV, Hart GW (1995). "Glycosylation of the c-Myc transactivation domain." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4417-21.
- Chou TY, Hart GW, Dang CV (1995). "c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas." J Biol Chem **270**(32): 18961-5.
- D'Lima D, Hermida J, Hashimoto S, Colwell C, Lotz M (2006). "Caspase inhibitors reduce severity of cartilage lesions in experimental osteoarthritis." Arthritis Rheum **54**(6): 1814-21.
- Davidoff AJ (2006). "Convergence of glucose- and fatty acid-induced abnormal myocardial excitation-contraction coupling and insulin signalling." Clin Exp Pharmacol Physiol **33**(1-2): 152-8.
- Degrell P, Cseh J, Mohás M, Molnar GA, Pajor L, Chatham JC, Fulop N, Wittmann I (2009). "Evidence of O-linked N-acetylglucosamine in diabetic nephropathy." Lie Sci **84**: 389-93.
- Del Carlo M Jr, Loeser RF (2008). "Cell death in osteoarthritis." Curr Rheumatol Rep **10**(1): 37-42.
- Dias W. B, Cheung W. D., Wang Z., and Hart G. W (2009). "Regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase IV by O-GlcNAc modification." J. Biol. Chem **284**: 21327-21337.
- Dias WB, Cheung WD, Wang Z, Hart GW (2009). "Regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase IV by O-GlcNAc modification." J Biol Chem **284**(32): 21327-21337.
- Dias WB, Hart GW (2007). "O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease." Mol Biosyst **3**(11): 766-72.
- Dodge GR, Jimenez SA (2003). "Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes." Osteoarthritis Cartilage **11**(6): 424-32.
- Dong DL, Hart GW (1994). "Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol." J Biol Chem **269**(30): 19321-30.
- Dougados M, Nguyen M, Berdah L, Mazières B, Vignon E, Lequesne M; ECHODIAH Investigators Study Group (2001). "Evaluation of the structure-modifying effects of diacerein in hip osteoarthritis: ECHODIAH, a three-year, placebo-controlled trial. Evaluation of the Chondromodulating Effect of Diacerein in OA of the Hip." Arthritis Rheum **44**(11): 2539-47.

- Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M (2001). "Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site." J Clin Invest **108**(9): 1341-8.
- Dudognon P, Maeder-Garavaglia C, Carpentier JL, Paccaud JP (2004). "Regulation of a COPII component by cytosolic O-glycosylation during mitosis." FEBS Lett **561**(1-3): 44-50.
- Duverger E, Roche AC, Monsigny M (1996). "N-acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins." Glycobiology **6**(4): 381-6.
- Ea HK, Nguyen C, Bazin D, Bianchi A, Guicheux J, Reboul P, Daudon M, Lioté F (2011). "Articular cartilage calcification in osteoarthritis: insights into crystal-induced stress." Arthritis Rheum **63**(1): 10-8.
- F. Luis González Flecha, Pablo R. Castello, Juan J. Gagliardino, Juan Pablo F.C. Rossi (2000). "La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento." Ciencia al día internacional **2**(3).
- Facundo HT, Brainard RE, Watson LJ, Ngoh GA, Hamid T, Prabhu SD, Jones SP (2012). "O-GlcNAc signaling is essential for NFAT-mediated transcriptional reprogramming during cardiomyocyte hypertrophy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **302**: H2122-H2130.
- Fajardo M, Di Cesare PE (2005). "Disease-modifying therapies for osteoarthritis : current status." Drugs Aging **22**(2): 141-61.
- Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R (2002). "Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells." Circulation **106**(4): 466-72.
- Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, Lane NE, Nevitt MC, Zhang Y, Sowers M, McAlindon T, Spector TD, Poole AR, Yanovski SZ, Ateshian G, Sharma L, Buckwalter JA, Brandt KD, Fries JF (2000). "Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors." Ann Intern Med **133**(8): 635-46.
- Fichter M, Körner U, Schömburg J, Jennings L, Cole AA, Mollenhauer J (2006). "Collagen degradation products modulate matrix metalloproteinase expression in cultured articular chondrocytes." J Orthop Res **24**(4): 63-70.
- Freeze HH (1998). "Disorders in protein glycosylation and potential therapy: tip of an iceberg?" J Pediatr **133**(5).
- Freeze HH, Aebi M (2005). "Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation." Curr Opin Struct Biol **15**(5): 490-8.
- Fülöp N, Feng W, Xing D, He K, Not LG, Brocks CA, Marchase RB, Miller AP, Chatham JC (2008). "Aging leads to increased levels of protein O-linked N-acetylglucosamine in heart, aorta, brain and skeletal muscle in Brown-Norway rats." Biogerontology **9**(3): 139-51.
- Fülöp N, Marchase RB, Chatham JC (2007). "Role of protein O-linked N-acetyl-glucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system." Cardiovasc Res **73**(2): 288-97.
- Fülöp N, Mason MM, Dutta K, Wang P, Davidoff AJ, Marchase RB, Chatham JC (2007). "Impact of Type 2 diabetes and aging on cardiomyocyte function and O-linked N-acetylglucosamine levels in the heart." Am J Physiol Cell Physiol **292**(4): C1370-8.
- Fülöp N, Zhang Z, Marchase RB, Chatham JC (2007). "Glucosamine cardioprotection in perfused rat hearts associated with increased O-linked N-acetylglucosamine protein modification and altered p38 activation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(5): H2227-36.
- Gandy J.C., Rountree A. E. and Bijur G. N (2006). "Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1." FEBS Lett **580**: 3051-3058.
- Gao Y, Miyazaki J, Hart GW (2003). "The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its

- DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells." Arch Biochem Biophys **415**(2): 155-63.
- Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW (2001). "Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain." J Biol Chem **30**(276(13)): 9838-45.
- Goldring MB, Berenbaum F (2004). "The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide." Clin Orthop Relat Res **427 Suppl**: S37-46.
- Goldring MB, Marcu KB (2009). "Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases." Arthritis Res Ther **11**(3): 224.
- Goldring SR, Goldring MB (2004). "The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis." Clin Orthop Relat Res **427 Suppl**: S27-36.
- Golks A, Tran TT, Goetschy JF, Guerini D (2007). "Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation." EMBO J **26**(20): 4368-79.
- Gouze JN, Bianchi A, Bécuwe P, Dauça M, Netter P, Magdalou J, Terlain B, Bordji K (2002). "Glucosamine modulates IL-1-induced activation of rat chondrocytes at a receptor level, and by inhibiting the NF-kappa B pathway." FEBS Lett **510**(3): 166-70.
- Gouze JN, Gouze E, Popp MP, Bush ML, Dacanay EA, Kay JD, Levings PP, Patel KR, Saran JP, Watson RS, Ghivizzani SC (2006). "Exogenous glucosamine globally protects chondrocytes from the arthritogenic effects of IL-1beta." Arthritis Res Ther **8**(6): R173.
- Groves JA, Lee A, Yildirim G, Zachara NE (2013). "Dynamic O-GlcNAcylation and its roles in the cellular stress response and homeostasis." Cell Stress Chaperones.
- Guinez C, Mir AM, Martin N, Leprince D, Michalski JC, Vergoten G, and L. T (2010). "Arginine 469 is a pivotal residue for the Hsc70-GlcNAc-binding property." Biochem Biophys Res Commun **400**(4): 537-542.
- Gurcel C, Vercoutter-Edouart AS, Fonbonne C, Mortuaire M, Salvador A, Michalski JC, Lemoine J (2008). "Identification of new O-GlcNAc modified proteins using a click-chemistry-based tagging." Anal Bioanal Chem **390**(8): 2089-97.
- H. Chen, B.L. Ing, K.A. Robinson, A.C. Feagin, M.G. Buse, M.J. Quon, (1997). "Effects of overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) and glucosamine treatment on translocation of GLUT4 in rat adipose cells." Mol. Cell. Endocrinol **135**(67-77).
- Haltiwanger RS, Blomberg MA, Hart GW (1992). "Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase." J Biol Chem **267**(13): 9005-13.
- Haltiwanger RS, Holt GD, Hart GW (1990). "Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase." J Biol Chem **265**(5): 2563-8.
- Han I, Kudlow JE (1997). "Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility." Mol Cell Biol **17**(5): 2550-8.
- Han I, Roos MD, Kudlow JE (1998). "Interaction of the transcription factor Sp1 with the nuclear pore protein p62 requires the C-terminal domain of p62." J Cell Biochem **68**(1): 50-61.
- Hanover JA (2001). "Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine." FASEB J **15**(11): 1865-76.
- Hanover JA, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, Kochran J, Love DC (2003). "Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene." Arch Biochem Biophys **409**(2): 287-97.
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O (2011). "Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease." Annu Rev Biochem **80**: 825-858.

- Hatsell S., Medina L., Merola J., Haltiwanger R., and Cowin, P (2003). "Plakoglobin is O-glycosylated close to the N-terminal destruction box." *J. Biol. Chem* **278**: 37745-37752.
- Hawkins M, Barzilai N, Liu R, Hu M, Chen W, Rossetti L (1997). "Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance." *J Clin Invest* **99**(9): 2173-82.
- Hazel M, Cooksey RC, Jones D, Parker G, Neidigh JL, Witherbee B, Gulve EA, McClain DA (2004). "Activation of the hexosamine signaling pathway in adipose tissue results in decreased serum adiponectin and skeletal muscle insulin resistance." *Endocrinology* **145**(5): 2118-28.
- Helenius J, Aebi M (2002). "Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum." *Semin Cell Dev Biol* **13**(3): 171-8.
- Hervnann A, Aussel C, Cynober L, Moatti N, Ekindjian OG (1992). "IL-1 beta, a strong mediator for glucose uptake by rheumatoid and non-rheumatoid cultured human synoviocytes." *FEBS Lett* **303**(1): 77-80.
- Hervnann A, Jaffray P, Hilliquin P, Cazalet C, Menkes CJ, Ekindjian OG (1996). "Interleukin-1 beta-mediated glucose uptake by chondrocytes. Inhibition by cortisol." *Osteoarthritis Cartilage* **4**(2): 139-42.
- Herrero-Beaumont G, Castañeda S (2006). "Importancia del Hueso Subcondral y la Membrana Sinovial en la Patogenia y Tratamiento de la Artrosis." *Reumatología* **22**(3): 79-80.
- Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Castañeda S, Jimenez SA (2009). "Primary osteoarthritis no longer primary: three subsets with distinct etiological, clinical, and therapeutic characteristics." *Semin Arthritis Rheum* **39**(2): 71-80.
- Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Largo R, Berenbaum F, Castañeda S (2011). "Bone mineral density and joint cartilage: four clinical settings of a complex relationship in osteoarthritis." *Ann Rheum Dis* **70**(9): 1523-5.
- Herrero-Beaumont G, Román JA, Muñoz J, Blanco FJ, Beito P, Martín E, Paulino J, Marengo JL, Porto A, Laffon A, Araujo D, Figueroa M, Branco (2005). "Effects of glucosamine sulfate on 6-month control of knee osteoarthritis symptom vs. placebo and acetaminophen: results from the Glucosamine Unum In Die Efficacy (GUIDE) trial." *Arthritis Rheum* **52**(9 Suppl): 1203.
- Herrero-Beaumont G, Rovati LC, Castañeda S, Alvarez-Soria MA, Largo R (2007). "The reverse glucosamine sulfate pathway: application in knee osteoarthritis." *Expert Opin Pharmacother* **8**(2): 215-25.
- Hochberg MC (2006). "Nutritional supplements for knee osteoarthritis--still no resolution." *N Engl J Med* **354**(8): 858-60.
- Hofbauer LC, Heufelder AE (2001). "Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology." *J Mol Med (Berl)* **79**(5-6): 243-53.
- Holt GD, Hart GW (1986). "The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc." *J Biol Chem* **261**(17): 8049-57.
- Homandberg GA, Wen C, Hui F (1998). "Cartilage damaging activities of fibronectin fragments derived from cartilage and synovial fluid." *Osteoarthritis Cartilage* **6**(4): 231-44.
- Hsieh T. J., Lin T., Hsieh P. C., Liao M. C. and Shin S. J (2012). "Sup-pression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase-1 inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes." *J. Cell. Physiol* **227**: 108-115.
- Hu Y, Belke D, Suarez J, Swanson E, Clark R, Hoshijima M, Dillmann WH (2005). "Adenovirus-mediated overexpression of O-GlcNAcase improves contractile function in the diabetic heart." *Circ Res* **96**: 1006-13.
- Hu Y, Suarez J, Fricovsky E, Wang H, Scott BT, Trauger SA, Han W, Hu Y, Oyeleye MO, Dillmann WH (2009). "Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose." *J Biol Chem* **284**(1): 547-55.

- Hughes R, Carr A (2002). "A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of glucosamine sulphate as an analgesic in osteoarthritis of the knee." Rheumatology (Oxford) **41**(3): 279-84.
- Hunton DL, Lucchesi PA, Pang Y, Cheng X, Dell'Italia LJ, Marchase RB (2002). "Capacitative calcium entry contributes to nuclear factor of activated T-cells nuclear translocation and hypertrophy in cardiomyocytes." J Biol Chem **277**(16): 14266-73.
- Imagawa K, de Andrés MC, Hashimoto K, Pitt D, Itoi E, Goldring MB, Roach HI, Oreffo RO (2011). "The epigenetic effect of glucosamine and a nuclear factor-kappa B (NF-kB) inhibitor on primary human chondrocytes--implications for osteoarthritis." Biochem Biophys Res Commun **405**(3): 362-7.
- Ise H, Kobayashi S, Goto M, Sato T, Kawakubo M, Takahashi M, and A. T. Ikeda U (2010). "Vimentin and desmin possess GlcNAc-binding lectin-like properties on cell surfaces." Glycobiology **20**(7): 843-864.
- Ishihara K., Takahashi I., Tsuchiya Y., Hasegawa M. and Kamemura K (2010). "Characteristic increase in nucleocytoplasmic protein glycosylation by O-GlcNAc in 3T3-L1 adipocyte differentiation." Biochem. Biophys. Res Commun **398**: 489-494.
- Jackson SP, Tjian R (1989). "Purification and analysis of RNA polymerase II transcription factors by using wheat germ agglutinin affinity chromatography." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(6): 1781-5.
- James LR, Tang D, Ingram A, Ly H, Thai K, Cai L, Scholey JW (2002). "Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor kappaB- dependent promoter activation." Diabetes **51**(4): 1146-56.
- Jang BC, Sung SH, Park JG, Park JW, Bae JH, Shin DH, Park GY, Han SB, Suh SI (2007). "Glucosamine hydrochloride specifically inhibits COX-2 by preventing COX-2 N-glycosylation and by increasing COX-2 protein turnover in a proteasome-dependent manner." J Biol Chem **282**(38): 27622-32.
- Jawed H, Anjum S, Awan SI, Simjee SU (2011). "Anti-arthritis effect of GN1, a novel synthetic analog of glucosamine, in the collagen-induced arthritis model in rats." Inflamm Res **60**(12): 1113-20.
- Jochmann R, Thureau M, Jung S, Hofmann C, Naschberger E, Kremmer E, Harrer T, Miller M, Schaft N, Stürzl M (2009). "O-linked N-acetylglucosaminylation of Sp1 inhibits the human immunodeficiency virus type 1 promoter." J Virol **83**(8): 3704-18.
- Jones SP, Zachara NE, Ngoh GA, Hill BG, Teshima Y, Bhatnagar A, Hart GW, Marbán E (2008). "Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins." Circulation **117**(9): 1172-82.
- Kamemura K, Hayes BK, Comer FI, Hart GW (2002). "Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens." J Biol Chem **277**(21): 19229-35.
- Kawaguchi H (2008). "Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models." Mol Cells **25**(1): 1-6.
- Kawaguchi H (2009). "Regulation of osteoarthritis development by Wnt-beta-catenin signaling through the endochondral ossification process." J Bone Miner Res **24**(1): 8-11.
- Kawasaki Y, Kugimiya F, Chikuda H, Kamekura S, Ikeda T, Kawamura N, Saito T, Shinoda Y, Higashikawa A, Yano F, Ogasawara T, Ogata N, Hoshi K, Hofmann F, Woodgett JR, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H (2008). "Phosphorylation of GSK-3beta by cGMP-dependent protein kinase II promotes hypertrophic differentiation of murine chondrocytes." J Clin Invest **118**(7): 2506-15.
- Kazemi Z, Chang H, Haserodt S, McKen C, Zachara NE (2010). "O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3beta-dependent manner." J Biol Chem **285**(50): 39096-107.

- Kearse KP, Hart GW (1991). "Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(5): 1701-1705.
- Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW (1993). "RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc." *J Biol Chem* **268**(14): 10416-24.
- Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC (2004). "Exploring the O-GlcNAc proteome: direct identification of O-GlcNAc-modified proteins from the brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(36): 13132-7.
- Kim EJ, Amorelli B, Abdo M, Thomas CJ, Love DC, Knapp S, Hanover JA (2007). "Distinctive inhibition of O-GlcNAcase isoforms by an alpha-GlcNAc thiolsulfonate." *J Am Chem Soc* **129**(48): 14854-5.
- Kim YH, Song M, Oh YS, Heo K, Choi JW, Park JM, Kim SH, Lim S, Kwon HM, Ryu SH, Suh PG (2006). "Inhibition of phospholipase C-beta1-mediated signaling by O-GlcNAc modification." *J Cell Physiol* **207**(3): 689-696.
- Kirsch T, Swoboda B, Nah H (2000). "Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage." *Osteoarthritis Cartilage* **8**(4): 294-302.
- Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A (1976). "Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus." *N Engl J Med* **295**(8): 417-20.
- Kornfeld R (1967). "Studies on L-glutamine D-fructose 6-phosphate amidotransferase. I. Feedback inhibition by uridine diphosphate-N-acetylglucosamine." *J Biol Chem* **242**(13): 3135-41.
- Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW (1997). "Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats." *J Biol Chem* **272**(14): 9308-15.
- Kreppel LK, Hart GW (1999). "Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats." *J Biol Chem* **274**(45): 32015-22.
- Kudlow JE (2006). "Post-translational modification by O-GlcNAc: another way to change protein function." *J Cell Biochem* **98**(5): 1062-75.
- Kwan Tat S, Amiable N, Pelletier JP, Boileau C, Lajeunesse D, Duval N, Martel-Pelletier J (2009). "Modulation of OPG, RANK and RANKL by human chondrocytes and their implication during osteoarthritis." *Rheumatology (Oxford)* **48**(12): 1482-90.
- Laczy B, Hill BG, Wang K, Paterson AJ, White CR, Xing D, Chen YF, Darley-Usmar V, Oparil S, Chatham JC (2009). "Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**(1): H13-28.
- Largo R, Alvarez-Soria MA, Díez-Ortego I, Calvo E, Sánchez-Pernaute O, Egido J, Herrero-Beaumont G (2003). "Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes." *Osteoarthritis Cartilage* **11**(4): 290-8.
- Largo R, Martínez-Calatrava MJ, Sánchez-Pernaute O, Marcos ME, Moreno-Rubio J, Aparicio C, Egido J, Herrero-Beaumont G (2009). "Effect of a high dose of glucosamine on systemic and tissue inflammation in an experimental model of atherosclerosis aggravated by chronic arthritis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(1): H268-76.
- Lazarus BD, Love DC, Hanover JA (2009). "O-GlcNAc cycling: implications for neurodegenerative disorders." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(11): 2134-46.
- Lee AT, Cerami A (1992). "Role of glycation in aging." *Ann N Y Acad Sci* **663**: 63-70.
- Lefebvre T, Cieniewski C, Lemoine J, Guerardel Y, Leroy Y, Zanetta JP, Michalski JC (2001). "Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins." *Biochem J* **360**(Pt 1): 179-88.
- Lefebvre T, Dehennaut V, Guinez C, Olivier S, Drougat L, Mir AM, Mortuaire M, Vercoutter-Edouart AS, Michalski JC (2010). "Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* **1800**(2): 67-79.

- Lefebvre T, Guinez C, Dehennaut V, Beseme-Dekeyser O, Morelle W, Michalski JC (2005). "Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases?" Expert Rev Proteomics **2**(2): 265-75.
- Lim K, Chang HI (2010). "O-GlcNAc inhibits interaction between Sp1 and sterol regulatory element binding protein 2." Biochem Biophys Res Commun **393**(2): 314-318.
- Lin L, Park S, Lakatta EG (2009). "RAGE signaling in inflammation and arterial aging." Front Biosci **14**: 1403-13.
- Lindquist S (1986). "The heat-shock response." Annu Rev Biochem **55**: 1151-1191.
- Liu J, Marchase RB, Chatham JC (2007). "Increased O-GlcNAc levels during reperfusion lead to improved functional recovery and reduced calpain proteolysis." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(3): H1391-9.
- Loeser RF (2006). "Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide." Arthritis Rheum **54**(5): 1357-60.
- Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB (2012). "Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ." Arthritis Rheum **64**(6): 1697-707.
- Love DC, Hanover JA (2005). "The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code"." Sci STKE **2005**(312): re13.
- Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA (1997). "O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats." J Biol Chem **272**(14): 9316-24.
- Lubas WA, Hanover JA (2000). "Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity." J Biol Chem **275**(15): 10983-8.
- Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K (2010). "Dietary advanced glycation end products and aging." Nutrients **2**(12): 1247-65.
- Lukic IK, Humpert PM, Nawroth PP, Bierhaus A (2008). "The RAGE pathway: activation and perpetuation in the pathogenesis of diabetic neuropathy." Ann N Y Acad Sci **1126**: 76-80.
- Lunde IG, Aronsen JM, Kvaløy H, Qvigstad E, Sjaastad I, Tønnessen T, Christensen G, Grønning-Wang LM, Carlson CR (2012). "Cardiac O-GlcNAc signaling is increased in hypertrophy and heart failure." Physiol Genomics **44**(2): 162-72.
- Maillard LC (1912). "Action des acides aminés sur les sucres; formation des melanoidines par voie methodique." C R Acad Sci **154**: 66-68.
- Maneiro E, Martin MA, de Andres MC, Lopez-Armada MJ, Fernandez-Sueiro JL, del Hoyo P, Galdo F, Arenas J, Blanco FJ (2003). "Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes." Arthritis Rheum **48**: 700- 708.
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A (1971). "Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data." J Bone Joint Surg Am **53**(3): 523-37.
- Marshall S, Bacote V, Traxinger RR (1991). "Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance." J Biol Chem **266**(8): 4706-12.
- Marshall S, Nadeau O, Yamasaki K. (2004). "Dynamic actions of glucose and glucosamine on hexosamine biosynthesis in isolated adipocytes: differential effects on glucosamine 6-phosphate, UDP-N-acetylglucosamine, and ATP levels." J Biol Chem **279**(34): 35313-9.
- Martin JA, Martini A, Molinari A, Morgan W, Ramalingam W, Buckwalter JA, McKinley TO (2012). "Mitochondrial electron transport and glycolysis are coupled in articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **20**(4): 323-9.
- Masson E, Lagarde M, Wiernsperger N, El Bawab S (2006). "Hyperglycemia and glucosamine-induced mesangial cell cycle arrest and hypertrophy: Common or independent mechanisms?" IUBMB Life **58**: 381-8.
- McAlindon TE (2006). "Nutraceuticals: do they work and when should we use them?" Best Pract Res Clin Rheumatol **20**(1): 99-115.

- McClain DA, Lubas WA, Cooksey RC, Hazel M, Parker GJ, Love DC, Hanover JA (2002). "Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10695-10699.
- McDaniel ML, Marshall CA, Pappan KL, Kwon G (2002). "Metabolic and autocrine regulation of the mammalian target of rapamycin by pancreatic beta-cells." Diabetes **51**(10): 2877-85.
- McNulty AL, Vail TP, Kraus VB (2005). "Chondrocyte transport and concentration of ascorbic acid is mediated by SVCT2." Biochim Biophys Acta **1712**(2): 212-21.
- Méndez JD, Xie J, Aguilar-Hernández M, Méndez-Valenzuela V (2010). "Molecular susceptibility to glycation and its implication in diabetes mellitus and related diseases." Mol Cell Biochem **344**(1-2): 185-93.
- Mer G, Hietter H, Lefèvre JF (1996). "Stabilization of proteins by glycosylation examined by NMR analysis of a fucosylated proteinase inhibitor." Nat Struct Biol **3**(1): 45-53.
- Mobasheri A (2012). "Glucose: an energy currency and structural precursor in articular cartilage and bone with emerging roles as an extracellular signaling molecule and metabolic regulator." Front Endocrinol (Lausanne) **3**:153.
- Mobasheri A, Carter SD, Martín-Vasallo P, Shakibaei M (2002). "Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes." Cell Biol Int **26**(1): 1-18.
- Moley KH, Mueckler MM (2000). "Glucose transport and apoptosis." Apoptosis **5**(2): 99-105.
- Moreno-Rubio J, Herrero-Beaumont G, Tardio L, Alvarez-Soria MA, Largo R (2010). "Nonsteroidal antiinflammatory drugs and prostaglandin E(2) modulate the synthesis of osteoprotegerin and RANKL in the cartilage of patients with severe knee osteoarthritis." Arthritis Rheum **62**(2): 478-88.
- Musacchio E, Ramonda R, Perissinotto E, Sartori L, Hirsch R, Punzi L, Zambon S, Corti MC, Baggio G, Manzano E, Doria A, Crepaldi G (2011). "The impact of knee and hip chondrocalcinosis on disability in older people: the ProVA Study from northeastern Italy." Ann Rheum Dis **70**(11): 1937-43.
- Nagy T, Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC (2006). "Glucosamine inhibits angiotensin II-induced cytoplasmic Ca²⁺ elevation in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-linked N-acetylglucosamine." Am J Physiol Cell Physiol **290**(1): C57-65.
- Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Kato T, Kamada T, Kawahara T (2007). "Effects of glucosamine administration on patients with rheumatoid arthritis." Rheumatol Int **27**(3): 213-8.
- Nakamura M, Barber AJ, Antonetti DA, LaNoue KF, Robinson KA, Buse MG, Gardner TW (2001). "Excessive hexosamines block the neuroprotective effect of insulin and induce apoptosis in retinal neurons." J Biol Chem **276**(47): 43748-55.
- Nakatani S, Mano H, Im R, Shimizu J, Wada M (2007). "Glucosamine regulates differentiation of a chondrogenic cell line, ATDC5." Biol Pharm Bull **30**(3): 433-8.
- Nishizawa Y, Koyama H, Inaba M (2012). "AGEs and cardiovascular diseases in patients with end-stage renal diseases." J Ren Nutr **22**(1): 128-33.
- Nolte D, Müller U (2002). "Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1." Mamm Genome **13**(1): 62-4.
- Nollen EA, Morimoto RI (2002). "Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2809-2816.
- Oegema TR Jr, Carpenter RJ, Hofmeister F, Thompson RC Jr (1997). "The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis." Microsc Res Tech **37**(4): 324-32.
- Oegema TR Jr, Deloria LB, Sandy JD, Hart DA (2002). "Effect of oral glucosamine on cartilage and meniscus in normal and chymopapain-injected knees of young rabbits." Arthritis Rheum **46**(9): 2495-503.

- Ozcan S, Andrali SS, Cantrell JE (2010). "Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification." *Biochim Biophys Acta* **1799**(5-6): 353-64.
- Pang Y, Hunton DL, Bounelis P, Marchase RB (2002). "Hyperglycemia inhibits capacitative calcium entry and hypertrophy in neonatal cardiomyocytes." *Diabetes* **51**(12): 3461-7.
- Park K, Saudek CD, Hart GW (2010). "Increased expression of beta-N-acetylglucosaminidase in erythrocytes from individuals with pre-diabetes and diabetes." *Diabetes* **59**(7): 1845-50.
- Patti ME, Virkamäki A, Landaker EJ, Kahn CR, Yki-Järvinen H (1999). "Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle." *Diabetes* **48**(8): 1562-71.
- Pavelká K, Gatterová J, Olejarová M, Machacek S, Giacobelli G, Rovati LC (2002). "Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study." *Arch Intern Med* **162**(18): 2113-23.
- Pelletier JP (2001). "Etiopathogenesis of osteoarthritis. A textbook of rheumatology." *arthritis and allied conditions*: 1969-84.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB (2001). "Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets." *Arthritis Rheum* **44**(6): 1237-47.
- Peppas M, Stavroulakis P, Raptis SA (2009). "Advanced glycoxidation products and impaired diabetic wound healing." *Wound Repair Regen* **17**(4): 461-72.
- Peppas M, Uribarri J, Vlassara H (2008). "Aging and glycoxidant stress." *Hormones (Athens)* **7**(2): 123-32.
- Phornphutkul C., Wu K. Y. and Gruppuso P. A (2006). "The role of insulin in chondrogenesis." *Mol. Cell. Endocrinol* **249**: 107-115.
- Poolsup N, Suthisisang C, Channark P, Kittikulsuth W (2005). "Glucosamine long-term treatment and the progression of knee osteoarthritis: systematic review of randomized controlled trials." *Ann Pharmacother* **39**(6): 1080-7.
- Pulai JJ, Chen H, Im HJ, Kumar S, Hanning C, Hegde PS, Loeser RF (2005). "NF-kappa B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments." *J Immunol* **174**(9): 5781-8.
- Rees JA, Ali SY (1988). "Ultrastructural localisation of alkaline phosphatase activity in osteoarthritic human articular cartilage." *Ann Rheum Dis* **47**(9): 747-53.
- Reginato AM, Iozzo RV, Jimenez SA (1994). "Formation of nodular structures resembling mature articular cartilage in long-term primary cultures of human fetal epiphyseal chondrocytes on a hydrogel substrate." *Arthritis Rheum* **37**(9): 1338-49.
- Reginster JY, Deroisy R, Rovati LC, Lee RL, Lejeune E, Bruyere O, Giacobelli G, Henrotin Y, Dacre JE, Gossett C (2001). "Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial." *Lancet* **357**(9252): 251-6.
- Rengifo J, Gibson CJ, Winkler E, Collin T, Ehrlich BE (2007). "Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type I by O-GlcNAc glycosylation." *J Neurosci* **27**(50): 13813-13821.
- Rex-Mathes M, Werner S, Strutas D, Griffith LS, Viebahn C, Thelen K, Schmitz B (2001). "O-GlcNAc expression in developing and ageing mouse brain." *Biochimie* **83**(7): 583-90.
- Rexach JE, Clark PM, Hsieh-Wilson LC (2008). "Chemical approaches to understanding O-GlcNAc glycosylation in the brain." *Nat Chem Biol* **4**(2): 97-106.
- Reynolds TM (1963). "Chemistry of nonenzymic browning. I. The reaction between aldoses and amines." *Adv Food Res* **12**: 1-52.
- Richy F, Bruyere O, Ethgen O, Cucherat M, Henrotin Y, Reginster JY (2003). "Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis." *Arch Intern Med* **163**(13): 1514-22.
- Roemer FW, Guermazi A, Javadi MK, Lynch JA, Niu J, Zhang Y, Felson DT, Lewis CE, Torner J, Nevitt MC; MOST Study investigators (2009). "Change in MRI-detected subchondral

- bone marrow lesions is associated with cartilage loss: the MOST Study. A longitudinal multicentre study of knee osteoarthritis." Ann Rheum Dis **68**(9): 1461-5.
- Rolo AP, Palmeira CM (2006). "Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress." Toxicol Appl Pharmacol **212**(2): 167-78.
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2001). "Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells." Trends Biochem Sci **26**(5): 310-7.
- Rosa SC, Gonçalves J, Judas F, Mobasher A, Lopes C, Mendes AF (2009). "Impaired glucose transporter-1 degradation and increased glucose transport and oxidative stress in response to high glucose in chondrocytes from osteoarthritic versus normal human cartilage." Arthritis Res Ther **11**(3): R80.
- Rosa SC, Rufino AT, Judas FM, Tenreiro CM, Lopes MC, Mendes AF (2011). "Role of glucose as a modulator of anabolic and catabolic gene expression in normal and osteoarthritic human chondrocytes." J Cell Biochem **112**(10): 2813-24.
- Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou YC, Wulf G, Rottapel R, Yamaoka S, Lu KP (2003). "Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA." Mol Cell Biol **23**(6): 1413-26.
- Saito I, Koshino T, Nakashima K, Uesugi M, Saito T (2002). "Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees." Osteoarthritis Cartilage **10**(2): 156-62.
- Sakaidani Y, Nomura T, Matsuura A, Ito M, Suzuki E, Murakami K, Nadano D, Matsuda T, Furukawa K, Okajima T (2011). "O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions." Nat Commun **2**:583.
- Samuels J, Krasnokutsky S, Abramson SB (2008). "Osteoarthritis: a tale of three tissues." Bull NYU Hosp Jt Dis **66**(3): 244-50.
- Sawitzke AD, Shi H, Finco MF, Dunlop DD, Bingham CO 3rd, Harris CL, Singer NG, Bradley JD, Silver D, Jackson CG, Lane NE, Oddis CV, Wolfe F, Lisse J, Furst DE, Reda DJ, Moskowitz RW, Williams HJ, Clegg DO (2008). "The effect of glucosamine and/or chondroitin sulfate on the progression of knee osteoarthritis: a report from the glucosamine/chondroitin arthritis intervention trial." Arthritis Rheum **58**(10): 3183-91.
- Sayat R, Leber B, Grubac V, Wiltshire L, Persad S (2008). "O-GlcNAc-glycosylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity." Exp Cell Res **314**(15): 2774-87.
- Schett G, Kleyer A, Perricone C, Sahinbegovic E, Iagnocco A, Zwerina J, Lorenzini R, Aschenbrenner F, Berenbaum F, D'Agostino MA, Willeit J, Kiechl S (2013). "Diabetes is an independent predictor for severe osteoarthritis: results from a longitudinal cohort study." Diabetes Care **36**(2): 403-9.
- Semba RD, Ferrucci L, Sun K, Beck J, Dalal M, Varadhan R, Walston J, Guralnik J, Fried L, P (2009). "Advanced glycation end products and their circulating receptors predict cardiovascular disease mortality in older community-dwelling women." Aging Clin. Exp. Res **21**: 182-190.
- Sheetz MJ, King GL (2002). "Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications." JAMA **288**(20): 2579-88.
- Sherman AL, Ojeda-Correal G, Mena J (2012). "Use of glucosamine and chondroitin in persons with osteoarthritis." PM R **4**(5 Suppl): S110-6.
- Simánek V, Kren V, Ulrichová J, Gallo J (2005). "The efficacy of glucosamine and chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: are these saccharides drugs or nutraceuticals?" Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **149**(1): 51-6.
- Slawson C, Housley MP, Hart GW (2006). "O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks." J Cell Biochem **97**(1): 71-83.

- Song M, Kim HS, Park JM, Kim SH, Kim IH, Ryu SH, Suh PG (2008). "O-GlcNAc transferase is activated by CaMKIV-dependent phosphorylation under potassium chloride-induced depolarization in NG-108-15 cells." Cell Signal **20**(1): 94-104.
- Stumpf JL, Lin SW (2006). "Effect of glucosamine on glucose control." Ann Pharmacother **40**(4): 694-8.
- Taljanovic MS, Graham AR, Benjamin JB, Gmitro AF, Krupinski EA, Schwartz SA, Hunter TB, Resnick DL (2008). "Bone marrow edema pattern in advanced hip osteoarthritis: quantitative assessment with magnetic resonance imaging and correlation with clinical examination, radiographic findings, and histopathology." Skeletal Radiol **37**(5): 423-31.
- Taylor, R. P., , Parker, G. J., Hazel, M. W., Soesanto, Y., Fuller, W., Yazzie, and a. M. M. J., D. A (2008). "Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N-acetylglucosaminyltransferase." J. Biol. Chem **283**: 6050-6057.
- Teo C, F., Ingale S, Wolfert MA, Elsayed GA, Nöt LG, Chatham JC, Wells L, Boons GJ (2010). "Glycopeptide-specific monoclonal antibodies suggest new roles for O-GlcNAc." Nat Chem Biol **6**(5): 338-43.
- Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE (2001). "Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes." Arthritis Rheum **44**(3): 585-94.
- Torres CR, Hart GW (1984). "Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc." J Biol Chem **259**(5): 3308-17.
- Troeberg L, Nagase H (2012). "Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis." Biochim Biophys Acta **1824**(4): 133-45.
- Uebelhart D (2008). "Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **16**(Suppl 3): S19-21.
- van der Kraan PM, van den Berg WB (2007). "Osteophytes: relevance and biology." Osteoarthritis Cartilage **15**(3): 237-44.
- van der Kraan PM, van den Berg WB (2008). "Osteoarthritis in the context of ageing and evolution. Loss of chondrocyte differentiation block during ageing." Ageing Res Rev **7**(2): 106-13.
- van der Kraan PM, van den Berg WB (2012). "Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration?" Osteoarthritis Cartilage **20**: 223-32.
- Varki A (1993). "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct." Glycobiology **3**(2): 97-130.
- Verbruggen G (2006). "Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases." Rheumatology (Oxford) **45**(2): 129-38.
- Vlassara H, Brownlee M, Cerami A (1984). "Accumulation of diabetic rat peripheral nerve myelin by macrophages increases with the presence of advanced glycosylation endproducts." J Exp Med **160**(1): 197-207.
- Vocadlo DJ (2012). "O-GlcNAc processing enzymes: catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation." Curr Opin Chem Biol **16**(5-6): 488-97.
- Vosseller K, Sakabe K, Wells L, Hart GW (2002). "Diverse regulation of protein function by O-GlcNAc: a nuclear and cytoplasmic carbohydrate post-translational modification." Curr Opin Chem Biol **6**(6): 851-7.
- Vosseller K, Trinidad JC, Chalkley RJ, Specht CG, Thalhammer A, Lynn AJ, Snedecor JO, Guan S, Medzihradsky KF, Maltby DA, Schoepfer R, Burlingame AL (2006). "O-linked N-acetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry." Mol Cell Proteomics **5**(5): 923-34.
- Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW (2002). "Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5313-8.

- Waine H, Nevinny D, Rosenthal J, Joffe IB (1961). "Association of osteoarthritis and diabetes mellitus." Tufts Folia Med **7**: 13-9.
- Wang J., Zhou J. and Bondy C. A (1999). "Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy." FASEB J **13**: 1985-1990.
- Wang SX, Lavery S, Dumitriu M, Plaas A, Grynblas MD (2007). "The effects of glucosamine hydrochloride on subchondral bone changes in an animal model of osteoarthritis." Arthritis Rheum **56**(5): 1537-48.
- Wang Z, Pandey A, Hart GW (2007). "Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation." Mol Cell Proteomics **6**(8): 1365-79.
- Watson LJ, Facundo HT, Ngoh GA, Ameen M, Brainard RE, Lemma KM, Long BW, Prabhu SD, Xuan YT, Jones SP (2010). "O-linked β -N-acetylglucosamine transferase is indispensable in the failing heart." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(41): 17797-802.
- Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A, Hart GW (2002). "Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase." J Biol Chem **277**(3): 1755-61.
- Wells L, Vosseller K, Cole RN, Cronshaw JM, Matunis MJ, Hart GW (2002). "Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications." Mol Cell Proteomics **1**(10): 791-804.
- Wells L, Vosseller K, Hart GW (2001). "Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc." Science **291**(5512): 2376-8.
- Wells L, Whelan SA, Hart GW (2003). "O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification." Biochem Biophys Res Commun **302**(3): 435-41.
- Whelan SA, Dias WB, Thiruneelakantapillai L, Lane MD, Hart GW (2010). "Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes." J Biol Chem **285**(8): 5204-5211.
- Whelan SA, Hart GW (2003). "Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation." Circ Res **93**(11): 1047-58.
- Whelan SA, Lane MD, Hart GW (2008). "Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling." J Biol Chem **283**(31): 21411-21417.
- Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ (2002). "Role of Akt/protein kinase B in metabolism." Trends Endocrinol Metab **13**(10): 444-5.
- Woolf AD, Pfleger B (2003). "Burden of major musculoskeletal conditions." Bull World Health Organ **81**(9): 646-56.
- Wopereis S, Lefeber DJ, Morava E, Wevers RA (2006). "Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review." Clin Chem **52**(4): 574-600.
- Wrabl JO, Grishin NV (2001). "Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily." J Mol Biol **314**(3): 365-374.
- Wu W, Billingham RC, Pidoux I, Antoniou J, Zukor D, Tanzer M, Poole AR (2002). "Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13." Arthritis Rheum **46**(8): 2087-94.
- Xing D, Gong K, Feng W, Nozell SE, Chen YF, Chatham JC, Oparil S (2011). "O-GlcNAc modification of NF κ B p65 inhibits TNF- α -induced inflammatory mediator expression in rat aortic smooth muscle cells." PLoS One **6**(8): e24021.
- Xu L, Servais J, Polur I, Kim D, Lee PL, Chung K, Li Y (2010). "Attenuation of osteoarthritis progression by reduction of discoidin domain receptor 2 in mice." Arthritis Rheum **62**(9): 2736-44.

- Yang S, Zou LY, Bounelis P, Chaudry I, Chatham JC, Marchase RB (2006). "Glucosamine administration during resuscitation improves organ function after trauma hemorrhage." *Shock* **25**(6): 600-7.
- Yang WH, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS, Cho JW (2006). "Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability." *Nat Cell Biol* **8**(10): 1074-83.
- Yang WH, Park SY, Nam HW, Kim do H, Kang JG, Kang ES, Kim YS, Lee HC, Kim KS, Cho JW (2008). "NFkappaB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(45): 17345-50.
- Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ, Evans RM (2008). "Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance." *Nature* **451**(7181): 964-9.
- Yang X, Su K, Roos MD, Chang Q, Paterson AJ, Kudlow JE (2001). "O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6611-6.
- Yang YR, Song M, Lee H, Jeon Y, Choi EJ, Jang HJ, Moon HY, Byun HY, Kim EK, Kim DH, Lee MN, Koh A, Ghim J, Choi JH, Lee-Kwon W, Kim KT, Ryu SH, Suh PG (2012). "O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability." *Aging cell* **11**(3): 439-448.
- Yki-Järvinen H, Virkamäki A, Daniels MC, McClain D, Gottschalk WK (1998). "Insulin and glucosamine infusions increase O-linked N-acetyl-glucosamine in skeletal muscle proteins in vivo." *Metabolism* **47**(4): 449-55.
- Zachara NE (2012). "The roles of O-linked β -N-acetylglucosamine in cardiovascular physiology and disease." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**: H1905-18.
- Zachara NE, Hart GW (2004 a). "O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress." *Biochim Biophys Acta* **1673**(1-2): 13-28.
- Zachara NE, Hart GW (2004 c). "O-GlcNAc modification: a nutritional sensor that modulates proteasome function." *Trends Cell Biol* **14**(5): 218-21.
- Zachara NE, Hart GW (2006). "Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc." *Biochim Biophys Acta* **1761**(5-6): 599-617.
- Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW (2004 b). "Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells." *J Biol Chem* **279**(29): 30133-42.
- Zhang F, Su K, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Kudlow JE (2003). "O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome." *Cell* **115**(6): 715-25.
- Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S (1997). "The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism." *Cell* **89**(3): 413-24.
- Zhuo Q, Yang W, Chen J, Wang Y (2012). "Metabolic syndrome meets osteoarthritis." *Nat Rev Rheumatol* **8**(12): 729-37.
- Zou L, Yang S, Champattanachai V, Hu S, Chaudry IH, Marchase RB, Chatham JC (2009). "Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF- κ B signaling." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**(2): H515-23.
- Zou L, Yang S, Hu S, Chaudry IH, Marchase RB, Chatham JC (2007). "The protective effects of PUGNAc on cardiac function after trauma-hemorrhage are mediated via increased protein O-GlcNAc levels." *Shock* **27**(4): 402-8.

ANEXO

Trabajos que incluyen parcialmente los resultados de esta tesis:

- **Tardío L**, Andrés-Bergós J, Zachara NE, Larrañaga-Vera A, Rodríguez-Villar C, Herrero-Beaumont G, Largo R. "O-linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) protein modification is increased in the cartilage of patients with knee osteoarthritis." (*Submitted*)
- **Tardío L**, Andrés-Bergós J, Herrero-Beaumont G, Largo R. "Study of the O-linked-N-Acetyl-Glucosaminylation of proteins induced by high doses of glucosamine and its correlation with osteoarthritis progression." (*En preparación*)

Trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis:

- Moreno-Rubio J, Herrero-Beaumont G, **Tardío L**, Alvarez-Soria MA, Largo R. "Nonsteroidal antiinflammatory drugs and prostaglandin E(2) modulate the synthesis of osteoprotegerin and RANKL in the cartilage of patients with severe knee osteoarthritis." *Arthritis Rheum.* 2010 Feb; 62(2):478-88.
- Martínez-Calatrava MJ, Prieto-Potín I, Roman-Blas JA, **Tardío L**, Largo R, Herrero-Beaumont G. "RANKL synthesized by articular chondrocytes contributes to juxta-articular bone loss in chronic arthritis." *Arthritis Res Ther.* 2012 Jun; 14(3):R149.
- Andrés-Bergós J, **Tardío L**, Larranaga-Vera A, Gómez R, Herrero-Beaumont G, Largo R. "The increase in O-linked N-acetylglucosamine protein modification stimulates chondrogenic differentiation both in vitro and in vivo." *J Biol Chem.* 2012 Sep; 287(40):33615-28.

Estos resultados han sido presentados en las siguientes reuniones científicas:

- 13th world congress of the osteoarthritis research society international OARSI:
Septiembre de 2008, Roma, Italia.

“NSAIDs AND SYSADOAs DIFFERENTLY REGULATE THE SYNTHESIS OF NEOANGIOGENESIS MEDIATORS IN HUMAN OSTEOARTHRITIC CHONDROCYTES IN CULTURE.”

J. Moreno-Rubio, G.Herrero-Beaumont, **L Tardío**, M. Bellido, R Largo.

- 14th world congress of the osteoarthritis research society international OARSI:
Septiembre de 2009, Montreal, Quebec, Canada.

“PGE2 MODULATES THE SYNTHESIS OF OSTEOPROTEGERIN (OPG) AND RANKL IN THE ARTICULAR CARTILAGE OF PATIENTS WITH KNEE OSTEOARTHRITIS.”

J. Moreno-Rubio, G.Herrero-Beaumont, **L Tardío**, M. Bellido, R Largo. Osteoarthritis and Cartilage. Vol. 17, supplm. 1, pp S113-S114.

- 31st American society for bone and mineral research annual meeting ASBMR:
Septiembre de 2009, Denver, Colorado, USA.

“PGE2 MODULATE THE SYNTHESIS OF OPG AND RANKL IN THE ARTICULAR CARTILAGE OF PATIENTS WITH KNEE OSTEOARTHRITIS.”

R Largo, J. Moreno-Rubio, **L Tardío**, MA. Alvarez-Soria, G.Herrero-Beaumont.

- XIV congreso de la sociedad Española de investigación ósea y metabolismo mineral SEIOMM:
Octubre de 2009, Santander, España.

“LA PROSTAGLANDINA E2 (PGE2) MODULA LA SÍNTESIS DE LA OSTEOPROTEGERINA (OPG) Y RANKL EN EL CARTÍLAGO DE PACIENTES CON ARTROSIS DE RODILLA.”

J. Moreno-Rubio, G.Herrero-Beaumont, **L Tardío**, M. Bellido, R Largo.

- 2010 world congress of the osteoarthritis research society international OARSI:
 Septiembre de 2010, Bruselas, Bélgica.
 “OSTEOARTHRITIS LEADS TO INCREASED LEVELS OF PROTEIN O-LINKED N-ACETYLGLUCOSAMINE IN THE CARTILAGE.”
L. Tardío, G. Herrero-Beaumont, E. Gómez-Barrena, J. Andrés and R. Largo.
 Osteoarthritis and Cartilage. Vol. 18, supplm. 2, pp S111-S112.

- 31st European workshop for rheumatology research EWRR:
 Marzo de 2011, Amsterdam, Holanda.
 “PROTEIN O-LINKED N-ACETYLGLUCOSAMINE LEVELS IN THE CARTILAGE OF PATIENTS WITH KNEE OSTEOARTHRITIS.”
L. Tardío, J. Andres, G.I Herrero-Beaumont and R. Largo.

- 39th annual congress European calcified tissue society ECTS:
 Mayo de 2012, Estocolmo, Suecia.
 “STUDY OF THE O-LINKED-N-ACETYL-GLUCOSAMINYLATION OF PROTEINS INDUCED BY HIGH DOSES OF GLUCOSAMINE AND ITS CORRELATION WITH OSTEOARTHRITIS PROGRESION.”
L. Tardío, J. Andrés-Bergós, G. Herrero-Beaumont, R. Largo.

- 39th annual congress European calcified tissue society ECTS:
 Mayo de 2012, Estocolmo, Suecia.
 “O-GLCNAC PROTEIN MODIFICATION STIMULATES CHONDROGENESIS IN VITRO AND HYPERTROPHY IN MOUSE.”
 J. Andrés-Bergós, **L. Tardío**, A. Villalvilla, R. Gomez, G. Herrero-Beaumont, R. Largo.

- 39th annual congress European calcified tissue society ECTS:

Mayo de 2012, Estocolmo, Suecia.

“DOES RANKL PRODUCED BY ARTICULAR CHONDROCYTES ACTIVELY PARTICIPATE IN JUXTA-ARTICULAR BONE LOSS RELATED TO CHRONIC ARTHRITIS?”

I. Prieto-Potin, M. J. Martínez-Calatrava, J. A. Román-Blas, **L. Tardío** , R. Largo , G. Herrero-Beaumont.

- 2012 world congress of the osteoarthritis research society international OARSI:

Abril de 2012, Barcelona, España.

“IDENTIFICATION OF AN EXTRACELULAR O-N-ACETYL-GLYCOSYLASE RESPONSIBLE FOR AN INCREASED LEVEL OF O-LINKED N-ACETYLGLUCOSAMINE MODIFIED PROTEINS IN THE CARTILAGE OF PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS.”

G. Herrero-Beaumont, **L. Tardío**, J. Andrés-Bergós, E. Gómez-Barrena, R. Largo.

- 2012 world congress of the osteoarthritis research society international OARSI:

Abril de 2012, Barcelona, España.

“STUDY OF THE O-LINKED-N-ACETYL-GLUCOSAMINYLATION OF PROTEINS INDUCED BY HIGH DOSES OF GLUCOSAMINE AND ITS CORRELATION WITH OSTEOARTHRITIS PROGRESSION.”

R. Largo, **L. Tardío**, J. Andrés-Bergós, G. Herrero-Beaumont.